



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

*INTERNATIONAL PhD SCHOOL IN BIOMOLECULAR AND
BIOTECHNOLOGICAL SCIENCES*

MICROBIOLOGIA E IMMUNOLOGIA

Studio di un nuovo algoritmo diagnostico per l'identificazione dei
micobatteri non tubercolari (NTM)

Tutor:
Professor Stefania Zanetti

PhD student:
dr Melania Ruggeri



La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della scuola di dottorato "International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences" dell'Università degli Studi di Sassari, negli anni accademici 2012/2015 – XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Indice

Introduzione	3
Storia	5
Distribuzione nell'ambiente	7
Classificazione	9
I micobatteri non tubercolari oggi	11
Patogenesi	18
Diagnosi	19
Terapia	21
Isolamento e identificazione	23
Scopo del lavoro	31
Materiali e metodi	34
Risultati	40
Discussione	48
Bibliografia	57

Introduzione

I micobatteri non tubercolari (NTM) comprendono tutte le specie appartenenti al genere *Mycobacterium* ad eccezione di *Mycobacterium tuberculosis* complex e *M. leprae*. Queste specie sono patogeni obbligati (Ioachimescu www.clevelandclinicmedem.com) e sono agenti eziologici di specifiche malattie, rispettivamente tubercolosi e lebbra, mentre i NTM sono solitamente saprofiti ambientali, ma possono causare infezioni anche gravi nell'uomo (Katoch 2004). Attualmente sono riconosciute più di 160 specie di NTM, le quali sono ampiamente diffuse nelle diverse matrici ambientali e variano notevolmente per quanto riguarda la capacità di causare malattia: alcune specie non sono patogene per l'uomo, alcune lo sono solo occasionalmente, infine altre lo sono quasi sempre (Falkinham 2009; www.thoracic.com). Non ci sono prove di una trasmissione dei NTM dall'uomo all'uomo o dall'animale all'uomo, per cui oggi è ampiamente accettato che la malattia viene acquisita attraverso l'esposizione ambientale, sebbene di solito non sia possibile identificare la specifica fonte di infezione (Marras 2002, Falkinham 2009).

L'elevato interesse che attualmente rivestono gli organismi NTM è il risultato di due importanti tendenze emerse recentemente: l'associazione delle infezioni NTM con l'AIDS e il riconoscimento che esse stanno emergendo in contesti in precedenza sconosciuti, con nuove manifestazioni cliniche. Un altro importante fattore che ha contribuito a una maggiore consapevolezza dell'importanza dei NTM come patogeni per l'uomo è il miglioramento delle procedure nei laboratori diagnostici di micobatteriologia, che ha avuto come risultati un maggior numero di isolamenti e una identificazione più rapida e accurata dei NTM dai campioni clinici (Griffith 2007).

La diagnosi di micobatteriosi non può prescindere dalla presenza di sintomatologia clinica e dall'isolamento e identificazione di specie dei NTM dai campioni clinici, senza la quale è difficile determinare il significato clinico di un isolato (Griffith 2007). La corretta identificazione di specie è essenziale anche per la scelta del regime terapeutico in caso di malattia.

Nel tempo, numerose tecniche sono state messe a punto per l'identificazione dei micobatteri, le quali devono rispondere da un lato alla necessità di differenziare il numero sempre crescente di specie scoperte e riconosciute, dall'altro a quella di formulare una diagnosi in tempi brevi. Tutte sono relativamente affidabili, sebbene il

grado di discriminazione sia piuttosto variabile, così come diversa è la possibilità di applicarle in contesti diagnostici differenti. Ancora oggi vengono intrapresi nuovi studi al fine di rendere l'identificazione di specie per i micobatteri un processo affidabile e al tempo stesso rapido ed economico. Recentemente, uno studio volto all'individuazione di nuove sequenze adatte a questo scopo ha messo in evidenza l'esistenza di diversi loci, segnalando tra questi il gene *dnaK* come un locus particolarmente discriminatorio e potenzialmente adatto a costituire un ottimo target per l'elaborazione di nuove tecniche di identificazione (Dai 2011).

Storia

I micobatteri non tubercolari (NTM) sono conosciuti sin dai tempi di Robert Koch, ma storicamente sono stati messi in ombra dal *M. tuberculosis* e considerati come semplici contaminanti (Jarembowski 2008).

Il loro potenziale patogeno fu riconosciuto agli inizi del Novecento (Katoch 2004), quando furono riportate le prime malattie polmonari con caratteristiche simili alla tubercolosi. Tuttavia, solo negli anni Cinquanta, nel momento in cui l'incidenza della tubercolosi diminuiva nelle aree del mondo in cui le condizioni socio-economiche stavano migliorando rapidamente, le malattie dovute a questi organismi divennero riconosciute con maggiore frequenza. (Griffith www.uptodate.com).

Tra i primi anni Cinquanta e gli anni Ottanta, ci fu una crescente consapevolezza dello spettro di malattie causate dai micobatteri non tubercolari, sebbene il numero di casi fosse limitato (Ioachimescu www.clevelandclinicedem.com). Il loro ruolo come agenti causali di malattia fu riconosciuto definitivamente quando i pazienti con AIDS cominciarono a sviluppare infezioni micobatteriche disseminate (Griffith 2007).

Questi organismi nel passato furono chiamati micobatteri atipici. Oltre ad essere conosciuti in questo modo, a queste specie micobatteriche sono stati assegnati vari nomi come anonimi, non tubercolari, ambientali, opportunisti e micobatteri diversi dai bacilli tubercolari (MOTT). Nessuno di questi termini è stato accettato universalmente e il termine micobatteri non tubercolari (NTM) sembra essere più accettabile. E' stato adottato dalla American Thoracic Society (ATS) nella sua dichiarazione (Katoch 2004, Griffith 2007).

Nel 1959 Runyon propose il primo sistema di classificazione per questi organismi sulla base del tasso di crescita, della morfologia della colonia e della pigmentazione in presenza o assenza di luce e li divise in quattro gruppi. L'approccio fenotipico alla base di tale sistema venne integrato con l'analisi di altre caratteristiche colturali e di attività metaboliche e negli anni 70 assunse un rigoroso carattere scientifico (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap1). In seguito, le conoscenze sul DNA dei micobatteri hanno permesso il passaggio all'approccio genotipico basato sull'analisi di regioni conservate nel genoma, che ha determinato un aumento repentino del numero di

specie che ogni anno vengono scoperte e riconosciute. (Griffith 2007, www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap1).

Distribuzione nell'ambiente

I micobatteri non tubercolari sono organismi liberi e saprofiti, oligotrofi, in grado di crescere su un gran numero di composti organici; inoltre, la loro parete esterna ricca di acidi micolici, è una vera e propria barriera idrofobica che li protegge da un'ampia varietà di agenti antimicrobici (Falkinham 2009). L'insieme di questi fattori ne determina l'ampia distribuzione nelle più diverse matrici ambientali: sono stati isolati dal suolo e dalla polvere, dalle piante e dagli animali, dall'acqua e dal cibo (Falkinham 1996, Jarembowski 2008, Ioachimescu www.clevelandclinicmedem.com, Tortoli 2009, Griffith www.uptodate.com, Reed 2006, Falkinham 2009, Kaevska 2014, McIntosh 2014).

Molte specie sono state isolate dalle acque naturali e dai sistemi di distribuzione dell'acqua potabile e sembrano resistere ai trattamenti di disinfezione che uccidono i comuni batteri, mettendoli in condizione di non avere competitori, e possedere una particolare capacità di formare biofilm (Falkinham 2001, Katoch 2004, Norton 2004, Falkinham 2009). I biofilm sono strati sottilissimi nell'interfaccia tra solido (rubinetto) e liquido (acqua) e sono riconosciuti come un sito frequente di crescita micobatterica. La parete idrofobica dei micobatteri permette l'adesione ai substrati solidi nell'ambiente acquatico, che favorisce la persistenza dei micobatteri e la loro resistenza al distacco dovuto a grossi flussi di liquido (Griffith 2007). Al tempo stesso, una parte delle cellule in replicazione viene rilasciata nel flusso d'acqua che attraversa le tubature, il che ne spiega la massiccia presenza nelle acque di rete (Covert 1999, Falkinham 2001).

I NTM possono essere rinvenuti anche come colonizzatori di apparecchi medicali come endoscopi e soluzioni chirurgiche (Jaremboski 2008).

Laddove l'habitat dell'uomo e quello dei micobatteri si sovrappongono è presente il rischio di un'esposizione ricorrente e, quindi, potenzialmente, di sviluppare un'infezione. Numerosi sono i lavori che dimostrano come l'esposizione a una determinata matrice ambientale in cui è stata riscontrata la presenza di micobatteri sia un potenziale fattore di rischio per l'acquisizione di una micobatteriosi: tra queste il suolo (De Groot 2006; Reed 2006), i sistemi di distribuzione dell'acqua potabile (von Reyn 1994), le tubature domestiche (Falkinham 2008) e degli ospedali (Wallace 1998).

Numerosi sono i reservoir animali: *M. avium* è stato isolato dagli uccelli domestici e selvatici (Dhama K, 2011), dai pesci (Beran 2006), dai linfonodi del suino, del cervo e di

altri mammiferi (Thorel 2001, Matlova 2004, Glawischnig 2006); *M. intracellulare* dai pesci (Beran 2006), *M. kansasii* dai pesci (Jacobs 2009, Beran 2006), *M. fortuitum* dai pesci e dagli uccelli (Beran 2006, Zanoni 2008), *M. flavescens* dai pesci (Beran 2006), *M. chelonae* dai pesci e dalla rana (Green 2000, Beran 2006, Zanoni 2008, Jacobs 2009), *M. gordoniae* dai pesci e dalle rane (Beran 2006, Zanoni 2008, Kirsch 2008, Sanchez-Morgado 2009, Jacobs 2009), *M. szulgai* dalle rane (Chai N, 2006), *M. xenopi* dalle rane (Schwabacher 1959), *M. marinum* dai pesci, dai rettili e dalle rane (Hernandez 2002, Ferreira 2004, Beran 2006, Jacobs 2009), *M. celatum* dai pesci (Beran 2006, Jacobs 2009), *M. nonchromogenicum* dai pesci (Zanoni 2008), *M. interjectum* dai pesci (Zanoni 2008, Jacobs 2009); *M. haemophilum* dai pesci, dai rettili e dalle blatte (Hernandez 2002, Pai 2003, Whipps 2012) e *M. ulcerans* dalle zanzare (Johnson 2007, Lavender 2011). Alcuni autori ritengono che tali reservoir possano svolgere un ruolo nelle malattie dell'uomo e alcuni ipotizzano un coinvolgimento diretto nella trasmissione della malattia (Pai 2003, Kern 1989, Huminer 1986, Lavender 2011), sebbene non sia mai stata dimostrata la trasmissione della malattia dagli animali (Griffith 2007).

Anche nelle piante sono state rinvenute diverse specie di micobatteri, anche internalizzate nei tessuti (Kaevska 2014, McIntosh 2014), e alcuni autori ritengono possano essere coinvolte nella diffusione e trasmissione della malattia (Kaevska 2014).

La distribuzione delle specie varia in funzione delle differenti località geografiche e da ciò e dal livello di contaminazione dell'ambiente locale dipendono con tutta probabilità le differenze geografiche nella frequenza delle malattie, così come nelle più comuni specie micobatteriche isolate dai campioni umani (Katoch 2003, Wolinski 2007, Jarzembowski 2008).

In quasi tutte le parti del mondo, le specie del *M. avium- intracellulare* complex sono le più frequenti cause di malattia, forse anche in relazione alla associazione con l'infezione da HIV/AIDS (Wolinski 1979, Horsburgh 1996, Von Reyn 1993, Martin-Casabona 2004, Griffith 2007), ma raramente sono state segnalate come causa di infezioni disseminate nei pazienti affetti da HIV/AIDS in Africa. (Griffith 2004). In Turchia e in Iran, e in alcune regioni europee quali il Belgio e la Repubblica Ceca, la specie NTM più frequentemente isolata è *M. fortuitum*, seguita dal *M. avium- intracellulare* complex (Martin-Casabona 2004). Negli Stati Uniti, le altre più comuni specie NTM patogene includono *M. kansasii* e *M. abscessus*; patogeni umani meno comuni includono le specie a crescita lenta *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. malmoense* e le specie a crescita

rapida *M. ulcerans*, e *M. massiliense*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (Good 1980, O' Brien 1987). *M. kansasii* è stato segnalato come patogeno anche in alcune aree dell'Europa, mentre i casi riportati dal Giappone, dall'Australia, dal Canada e dai paesi scandinavi sono pochissimi (Wolinski 1992).

Nel sud-est dell'Inghilterra, in Canada e nei paesi scandinavi, *M. xenopi* e *M. malmoense* rappresentano le specie più comunemente isolate in campioni umani, mentre il loro isolamento è stato riportato raramente nel resto del mondo. (Wolinski 2007, Jarzembowski 2008). *M. ulcerans* è causa di malattia quasi esclusivamente nell'Africa tropicale e in Australia (Wolinski 1992). *M. gordonae* è ampiamente diffuso nell'ambiente e viene spesso isolato anche nei campioni clinici, ma raramente è causa di malattia (Griffith 2014).

Classificazione

Nel 1959 Runyon propose il primo sistema di classificazione per questi organismi sulla base del tasso di crescita, della morfologia della colonia e della pigmentazione in presenza o assenza di luce e li divise in quattro gruppi:

Gruppo 1- Fotocromogeni: specie che crescono in più di 7 giorni e formano pigmenti quando sono esposte alla luce.

Gruppo 2- Scotocromogeni: specie che crescono in più di 7 giorni e formano pigmenti al buio.

Gruppo 3- Specie che crescono in più di 7 giorni e non formano pigmenti.

Gruppo 4- Specie che crescono in meno di 7 giorni.

Nel tempo il numero di specie micobatteriche riconosciute è cresciuto notevolmente, e pertanto è stato necessario adottare sistemi di classificazione basati su tecniche più moderne e affidabili. Inizialmente l'approccio è stato quello dello studio delle particolarità fenotipiche delle singole specie, approccio che si è rivelato inadeguato a causa dell'impossibilità di differenziare tra loro numerose specie. Attualmente, la classificazione è basata sull'analisi genetica di sequenze specifiche del DNA micobatterico altamente conservate, che ha determinato un aumento vertiginoso del numero di specie che ogni anno vengono scoperte e riconosciute. (Griffith 2007, Dai 2011).

Nonostante ciò, il sistema di classificazione di Runyon può essere considerato ancora oggi uno strumento valido per il medico, dal momento che è in grado di fornire una speciazione presuntiva importante da un punto di vista clinico (Griffith www.uptodate.com, Schlossberg 1999). Infatti, i micobatteri a crescita lenta sono più spesso responsabili di malattie polmonari e linfadeniti, mentre quelli a crescita rapida colpiscono prevalentemente la cute, le ossa e le articolazioni (Tortoli 2003). Inoltre, le due tipologie differiscono per la suscettibilità ai farmaci antimicobatterici (NCCLS 2003).

I micobatteri non tubercolari oggi

Nei paesi industrializzati la frequenza delle malattie attribuibili ai NTM è cresciuta sia in termini di numeri assoluti, sia in termini di proporzione sul totale delle malattie causate dai micobatteri (Wolinski 1992). Ciò è in parte dovuto all'incremento del numero di individui suscettibili a tali malattie, a causa di condizioni fisiche predisponenti o immunocompromessi a causa della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), di neoplasie, di malattie croniche o di terapie quali un trapianto d'organo e l'assunzione di steroidi (Wolinski 1992). L'altro fattore responsabile di una crescente consapevolezza del ruolo dei NTM come patogeni per l'uomo è il continuo progresso delle metodiche diagnostiche relative al settore micobatteriologico, che ha come risultati una maggiore frequenza di isolamento e una più rapida e accurata identificazione dei NTM dai campioni clinici (Griffith 2007). Tutto ciò ha permesso di riconoscere nuovi tipi di malattie causate da NTM, anche in contesti che in precedenza non erano stati presi in considerazione, e di comprendere meglio l'associazione tra le singole specie micobatteriche e le patologie di cui sono responsabili (Katoch 2004, Griffith 2007). Circa un terzo delle specie conosciute sono state associate a malattie nell'uomo: *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. habana*, *M. interjectum*, *M. xenopi*, *M. heckehornense*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. immunogenum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. genavense*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. malmoeense*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. wolinski*, *M. goodii*, *M. thermoresistibile*, *M. neoaurum*, *M. vaccae*, *M. palustre*, *M. elephantis*, *M. septicum*, *M. nonchromogenicum* (Katoch, 2004).

In generale gli studi riportano una crescita nel numero e nella distribuzione delle infezioni NTM, ma i valori reali di incidenza e prevalenza sono sconosciuti in quanto essendo malattie non trasmissibili non è richiesta la notifica di tali infezioni ai dipartimenti di sanità pubblica (Griffith 2007, Jarembowski 2008). Nelle nazioni occidentali l'incidenza stimata è compresa tra 1,0 e 1,8 casi per 100 000 abitanti (Griffith 2007), e la prevalenza tra 14 e 35 per 100 000 abitanti (www.thoracic.org). Il tasso di mortalità è di circa 0,1 per 100 000 abitanti ed è in crescita; la maggior parte delle morti si verifica in ambito ospedaliero e interessa per lo più i soggetti anziani (Mirseidi 2014).

Le indagini cliniche ed epidemiologiche hanno permesso di individuare quattro categorie di persone particolarmente suscettibili alle infezioni da NTM:

- 1) soggetti con malattie strutturali ai polmoni, quali la malattia polmonare cronica ostruttiva, la fibrosi cistica, la bronchiectasia, una precedente tubercolosi o un'aspirazione cronica;
- 2) pazienti in trattamento con farmaci anti TNF-ALFA;
- 3) soggetti con infezione da HIV;
- 4) soggetti che presentano mutazioni genetiche nelle vie dell'IL-12 o dell'IFN- γ (Nontubercular Mycobacterial Disease 2).

Tuttavia, sono stati segnalati numerosi casi in soggetti che non solo non rientrano nelle suddette categorie, ma che a parte l'infezione micobatterica non presentano, almeno in apparenza, altre condizioni patologiche; ciò ha portato gli studiosi a rivedere queste posizioni e a ritenere che l'infezione sia probabilmente il risultato dell'interazione tra i meccanismi di difesa dell'ospite e il livello di esposizione ai micobatteri (Margaret 2014) e che sebbene tutti siano virtualmente esposti ai NTM, questi causano malattia solo negli individui che presentano condizioni predisponenti dovute a un'alterata immunità locale o sistemica. Le malattie possono essere localizzate o assumere la forma disseminata in relazione alla predisposizione locale e/o al grado di deficit immunitario (Katoch, 2004). Nonostante i progressi negli studi, in generale si può affermare che la suscettibilità ai NTM non è stata pienamente compresa e pertanto finora non è stato possibile mettere a punto piani di prevenzione.

Per quanto riguarda le modalità di infezione, gli studiosi sono concordi che non esista la possibilità di trasmissione dei NTM da persona a persona o da animale a persona (von Reyn 1993, Griffith 2007, Tortoli 2009, Falkinham 2009), pertanto si ritiene che gli esseri umani si infettino mediante l'esposizione ambientale, attraverso l'inalazione di aerosol o per diretto contatto attraverso la cute o la mucosa la cui integrità è alterata, sebbene la fonte specifica di infezione non possa essere identificata (von Reyn 2002).

Dal momento che si tratta di organismi ubiquitari e che la possibilità di infezione è legata ad una compromissione, anche locale, dello stato immunitario del soggetto, virtualmente ogni organo può essere colpito. Le più comuni manifestazioni cliniche delle infezioni causate dai NTM sono la malattia polmonare, le infezioni dei tessuti molli e della cute, la linfadenite e la malattia disseminata (Griffith 2007).

I casi di interessamento polmonare rappresentano circa il 77% di tutti i casi, le infezioni della pelle e dei tessuti molli sono le forme più comuni extrapolmonari, rappresentando circa il 12% di tutti i casi; le linfadeniti rappresentano circa il 4% delle micobatteriosi totali; le forme disseminate, definite come quelle in cui viene isolato un NTM da un sito normalmente sterile, quale sangue, midollo osseo o altri fluidi sterili quali liquido cefalorachidiano, sono circa il 5% dei casi totali (Wolinski 1992, Katoch 2004, Cassidy 2009, Ioachimescu www.clevelandclinicmedem.com, www.thoracic.org).

Malattia polmonare

Il polmone può essere facilmente colpito per inalazione di micobatteri in forma aerosolizzata ed è di gran lunga il sito più frequente di infezione umana. Esistono due quadri chiaramente distinti. Il primo si verifica nei pazienti HIV-negativi, in cui la malattia è indistinguibile dalla tubercolosi ed è caratterizzata da una progressione molto lenta. (Field 2004). Le manifestazioni variano dall'assenza di sintomi alla malattia cavitaria, e la radiografia può rivelare fibrosi, cavitazione del lobo superiore, opacità nodulare o parenchimale, ispessimento delle pleure. La popolazione più colpita è rappresentata da anziani con condizioni polmonari predisponenti (silicosi, malattia polmonare ostruttiva, bronchiectasia, pregressa tubercolosi o cancro). Inoltre la malattia colpisce anche donne senza fattori predisponenti chiaramente riconoscibili. (Griffith 2007, Tortoli 2009). I sintomi includono tosse, febbre, perdita di peso, debolezza o insufficienza respiratoria (Tortoli 2009).

Nei soggetti affetti da AIDS, invece, il quadro radiografico è spesso normale o può rivelare adenopatia ilare o mediastinica, e la progressione è molto rapida. I sintomi più frequenti sono tosse, febbre e perdita di peso. I pazienti sono per lo più gravemente immunocompromessi e hanno una conta linfocitaria minore di 100/μl. Negli anni recenti, l'introduzione di trattamenti antiretrovirali con elevata attività ha ridotto drasticamente la frequenza della malattia polmonare nei pazienti HIV-positivi.

I NTM più frequentemente responsabili di infezioni polmonari appartengono al *Mycobacterium avium* complex (MAC) con le sue due maggiori specie *Mycobacterium avium* e *M. intracellulare*. In Europa, sono molto frequenti anche le infezioni causate da *M. xenopi* e *M. scrofulaceum*, in particolare nelle regioni scandinave, da *M. malmoense*. Negli Stati Uniti, invece, sono nettamente prevalenti quelle causate da *M. kansasii*. Di recente, è stato segnalato un numero crescente di infezioni NTM causate da *M.*

abscessus e specie ad esse correlate (Tortoli 2009, Katoch 2004). Altre specie associate a malattia sono *M. simiae*, *M. habana*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. heckeshornense*.

Infezioni cutanee e dei tessuti molli

Le micobatteriosi della cute e dei tessuti molli sono caratterizzate da lesioni granulomatose che si sviluppano un paio di settimane dopo l'infezione. Possono essere interessati anche i linfonodi satelliti e può verificarsi l'evoluzione in ulcerazione e cellulite, e, nei casi più gravi, la disseminazione cutanea e batteriemia (Tortoli 2009, Katoch 2004). Le più comuni cause di infezione includono il contatto con l'acqua contaminata o pesci infetti, traumi e ferite chirurgiche. Tra le specie che causano infezioni cutanee vi sono *Mycobacterium marinum*, che colpisce coloro che possiedono acquari e altre persone in contatto con i pesci, e causa lesioni, generalmente sulle mani o negli avambracci, le quali sono inizialmente nodulari, ma possono ulcerarsi e coinvolgere i tessuti vicini, comprese le ossa e le articolazioni; *M. ulcerans*, agente eziologico dell'ulcera del Buruli, la terza più comune causa di micobatteriosi dopo la tubercolosi e la lebbra, particolarmente frequente in Africa e in Australia. La malattia si manifesta con forti ulcere necrotizzanti, le quali non sono fatali, ma portano allo sviluppo di grosse cicatrici altamente invalidanti; *M. haemophilum* può essere responsabile di dolorosi ascessi dei tessuti molli, talvolta con ricadute, nei pazienti immunocompromessi. Spesso numerosi organismi a crescita rapida sono coinvolti in infezioni post-traumatiche o post-chirurgiche; tra questi, le specie più frequentemente riportate includono *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, che causano lesioni purulente spesso susseguenti a semplici pratiche di iniezione cutanea, e *M. immunogenum*, una nuova specie emergente, ad esse correlata, in grado di causare anche sepsi. Inoltre sempre più frequentemente vengono descritti casi causati da *M. szulgai* e *M. vaccae* (Brown 1999; Viana-Niero 2008). Altre specie isolate sono: *M. smegmatis*, *M. wolinski*, *M. goodii*, *M. massiliense*, *M. thermoresistibile*, *M. palustre*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. nonchromogenicum* e *M. septicum* (Katoch 2004). Dal momento che il numero di specie segnalate è in continuo aumento, alcuni autori ritengono che virtualmente ogni specie possa essere causa di questo tipo di micobatteriosi (Griffith 2007).

Infezioni delle ossa e delle articolazioni

I NTM possono causare infezioni granulomatose croniche a livello di ossa, articolazioni, borse sierose, guaine tendinee, e protesi articolari. (Schlossberg 1999). Tali infezioni originano spesso da traumi, interventi chirurgici (Tortoli 2009) o procedure mediche che prevedono iniezioni nei siti articolari, particolarmente in soggetti affetti da artrite reumatoide (Schlossberg 1999). Da un punto di vista clinico, è presente generalmente un ingrossamento della parte accompagnato da dolore e associato a difficoltà di movimento. La funzionalità articolare è spesso gravemente compromessa, si possono osservare ispessimenti dei tendini e delle sinovie, e può verificarsi l'evoluzione in osteomielite (Kelly 1967, Schlossberg 1999). Tra le condizioni predisponenti vi sono i reumatismi articolari e i trattamenti steroidei. Nelle infezioni di ossa e articolazioni è stato segnalato il coinvolgimento di *Mycobacterium avium* complex, *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. asiaticum*, *M. flavescens*, *M. szulgai*, *M. xenopi* e *M. thermoresistibile* (Katoch 2004, Tortoli 2009), mentre in quelle di borse sierose e guaine tendinee oltre alle specie suddette sono state isolate anche *M. fortuitum*, causa di infezioni piogeniche e *M. marinum*, soprattutto nei pazienti affetti da AIDS (Katoch 2004).

Linfoadeniti

L'infezione dei linfonodi sottomascellari, sottomandibolari, cervicali o preauricolari nei bambini tra 1 e 5 anni di età è la più comune forma di linfoadenite dovuta a NTM. In assenza di infezione da HIV, la linfoadenite raramente colpisce gli adulti. La via d'infezione è molto probabilmente la bocca, e l'abitudine dei bambini di portare alla bocca le mani e gli oggetti può spiegare la particolare suscettibilità dei bambini verso questa patologia. Il grado di gonfiore del collo, che non è dolorante, varia in modo considerevole e non è rara la fistolizzazione. La diagnosi definitiva di linfoadenite da NTM è formulata attraverso l'esame culturale. (Griffith 2007, Hazra 1999). Un notevole cambiamento nei decenni recenti ha riguardato l'eziologia della linfoadenite cervicale; *M. scrofulaceum*, considerato in precedenza la causa prevalente della malattia, è divenuto meno comune, mentre *M. avium* è isolato con frequenza sempre maggiore (Wolinsky 1995). Altre specie isolate in casi di linfoadenite sono *M. bohemicum*, *M. szulgai* e in particolare *M. interjectum*, una specie descritta in anni recenti le cui caratteristiche ricordano quelle di *M. scrofulaceum* (Katoch 2004).

Malattia disseminata

Le micobatteriosi disseminate (DNTM) si sviluppano quasi esclusivamente nei soggetti con gravi deficienze del sistema immunitario (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3). La maggior parte dei casi si verifica in soggetti con infezione da HIV, i quali si trovino in uno stato di grave immunocompromissione, come si evince da conte molto basse dei linfociti T CD4⁺. Si ritiene che circa il 50% dei soggetti con una conta linfocitaria minore di 100/μl ne sia colpito (Collins 1989). La via di ingresso più probabile è costituita dall'apparato respiratorio o dal tratto gastrointestinale, come si evince dalla sintomatologia e dai risultati delle indagini anatomopatologiche (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3).

Il maggior numero di infezioni disseminate è dovuto al *Mycobacterium avium complex*, responsabile fino a qualche anno fa di circa il 96% di casi negli adulti (Horsburgh 1989) e di più dell'85% dei casi nei bambini (Horsburgh 1993); in particolare sono causate da *M. avium*, che rispetto a *M. intracellulare* sembra avere una spiccata propensione a causare malattia in questi soggetti (Portaels 1991). Sono stati segnalati anche casi di infezioni miste, in cui oltre a MAC sono state isolate altre specie NTM come *M. kansasii* (Massenkeil 1992) e *M. simiae* (Lévy-Frébault 1987). In tempi più recenti ha assunto un ruolo sempre più importante *M. genavense*, segnalato come possibile responsabile di circa il 10% dei casi di infezione disseminata (Pechère 1995). Altre specie responsabili di infezione disseminata sono *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. haemophilum*, *M. celatum*, *M. colombiense*, *M. conspicuum* e *M. malmoense* (Springer 1995, Katoch 2004, www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3). Non è ancora chiaro il motivo per cui alcune specie sono maggiormente coinvolte rispetto ad altre nei casi di AIDS: i dati epidemiologici mostrano infatti che fattori quali la maggiore diffusione ambientale o la maggiore virulenza non sono in alcun modo correlati alla frequenza di infezione (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3).

Oggi, l'incidenza della malattia disseminata da NTM è notevolmente diminuita nei pazienti affetti da HIV/AIDS, grazie all'avvento dei farmaci antiretrovirali ad alta efficacia (Karakousis 2004). Parallelamente si è osservato un aumento della sua incidenza nei soggetti con deficit immunitari di natura congenita o acquisita, in pazienti affetti da emopatie maligne e in quelli con uno stato di immunosoppressione indotto da trattamenti quali terapie croniche con corticosteroidi o farmaci antirigetto utilizzati in

caso di trapianto d'organo (Skogberg 1995, Vejlgard 2013, www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3).

Gli individui con immunodeficienze che coinvolgono i linfociti CD4, l'interferon- γ (IFN- γ) e il tumor necrosis factor- α (TNF- α), fattori che giocano un ruolo cruciale nella difesa dai microrganismi intracellulari, sono particolarmente esposti allo sviluppo di micobatteriosi disseminate. Sono stati segnalati numerosi casi in soggetti affetti da linfopenia CD4 idiopatica, o presentanti mutazioni nei recettori IFN- γ -specifici a livello delle cellule immunitarie o produzione di autoanticorpi anti-IFN- γ), e nei pazienti sottoposti a terapia a base di anticorpi anti-TNF- α (terapia biologica) per il trattamento di svariate patologie autoimmuni. La specie maggiormente coinvolta è il MAC, seguita dai micobatteri a crescita rapida (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3).

Nei pazienti affetti da patologie neoplastiche ematologiche le specie maggiormente isolate sono quelle a crescita rapida, seguite da MAC, *M. kansasii* e da nuove specie recentemente segnalate quali *M. hackensackense* (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3).

L'incidenza delle micobatteriosi disseminate è molto elevata anche nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo e di rene e numerose specie sono state segnalate come agenti causali (Tortoli 2009). Tra queste le più comuni sono MAC, *M. haemophilum* e *M. genavense* (Tortoli e Piersimoni). Altre specie sono *M. immunogenum*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. simiae*, *M. genavense* (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3, Katoch 2004).

Inoltre i micobatteri a crescita rapida sono responsabili di sepsi nei soggetti immunodepressi; le specie maggiormente coinvolte sono *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* e *M. neoaurum* (Brown-Elliott 2002, Wallace 1990). Altre specie segnalate sono *M. goodii*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum*, *M. septicum* e *M. wolinskyi* (Tortoli 2003, Tortoli 2004).

Patogenesi

I NTM penetrano nell'organismo ospite attraverso le vie respiratorie, il tratto gastrointestinale e l'inoculazione diretta nella cute e nei tessuti molli. Le caratteristiche istopatologiche delle infezioni causate dai NTM sono, per la maggior parte, indistinguibili da quelle causate da *M. tuberculosis* ad eccezione delle lesioni di *M. ulcerans*, che suscitano una risposta prevalentemente neutrofila. Nella fase iniziale i micobatteri sono fagocitati dai macrofagi, con un successivo rilascio di citochine e conseguente risposta infiammatoria. Inizialmente, vengono richiamati i neutrofili che uccidono la maggior parte della popolazione micobatterica. Alcuni micobatteri possono crescere nei macrofagi, dove inibiscono la fusione fagolisosomale. Alcuni batteri sono digeriti, e i prodotti antigenici sono trasportati ai linfonodi regionali, dove si generano linfociti di tipo TH1 (immunità cellulo-mediata di tipo 4).

Conseguentemente alla fagocitosi, i monociti e i macrofagi stimolati secernono interleuchine 1, 6 e 12 e il tumor necrosis factor α (TNF- α). Successivamente, avviene un'attivazione dei linfociti CD4, TH1 helper mediata dall'interleuchina 12. Tra gli altri eventi, i linfociti secernono interferon- γ , interleuchina 2, e ulteriore TNF- α . Queste citochine attivano ulteriormente i macrofagi per uccidere i micobatteri. L'attivazione delle cellule natural killer potenzia il ruolo dei macrofagi nell'uccisione dei micobatteri, mentre i linfociti citolitici CD8 sembrano giocare un ruolo nella lisi dei macrofagi infestati dai micobatteri. Nel corso delle infezioni micobatteriche sono generati anche anticorpi, ma non è chiaro che ruolo essi svolgano (Collins 1981, Newman 1991, Roeklein 1992).

Diagnosi

La diagnosi di micobatteriosi è spesso una sfida, dal momento che in genere le infezioni micobatteriche presentano sintomi aspecifici e il sospetto diagnostico arriva dopo l'esclusione di un coinvolgimento da parte di patogeni più comuni.

La diagnosi definitiva è basata sulla presenza di sintomi clinici e sull'isolamento e successiva identificazione di specie dei micobatteri presenti nei campioni clinici del paziente. La presenza di sintomi può portare a una diagnosi presunta, che tuttavia non è di per sé adeguata per intraprendere una terapia (Griffith 2007).

D'altro canto, a causa della presenza ubiquitaria dei NTM nell'ambiente, del fatto che solo un terzo delle specie conosciute sono patogene e che in ogni caso si tratta di patogeni occasionali, il loro semplice isolamento da un campione non significa che il paziente abbia una micobatteriosi: occorre, infatti, valutare la tipologia del campione in esame e gli eventuali sintomi clinici.

L'isolamento di NTM da un campione prelevato da un sito sterile è un fattore che deve portare a considerare seriamente la presenza di un'infezione; gli studi dimostrano che la quasi totalità (91-98%) degli isolati NTM dal tessuto linfatico, dall'osso o dai tessuti molli sono significativi da un punto di vista clinico. Quando l'isolamento viene fatto da un sito di per sé non sterile, è più difficile interpretarne il significato.

Tradizionalmente, si è introdotto il termine colonizzazione per differenziare i soggetti che non avevano evidenza di una malattia progressiva da quelli che l'avevano. Per le persone ritenute colonizzate da micobatteri ambientali, non era prescritto alcun trattamento. Per aiutare i clinici a determinare se una specie NTM sia o no causa di malattia in un soggetto, sono state sviluppate alcune linee guida sulla base di parametri clinici e microbiologici, e talvolta radiografici, per distinguere la malattia dalla colonizzazione (Katoch, 2001; Wallace 1990, Griffith 2007, www.thoracic.org).

Il concetto di colonizzazione è stato sviluppato inizialmente per indicare la presenza di NTM nelle vie aeree in assenza di sintomi di malattia polmonare. Tuttavia non sono mai stati effettuati studi rigorosi per chiarire il significato della colonizzazione, forse anche a causa del fatto che la fisiopatologia della malattia polmonare da NTM è scarsamente conosciuta, per cui non si può essere certi che la colonizzazione sia un evento trascurabile o un'infezione che procede lentamente. (Griffith 2007). In altri casi,

l'isolamento di un NTM dal tratto respiratorio è accompagnato dalla presenza di sintomi clinici. Tuttavia occorre considerare che il rischio di contaminazione dell'espettorato da parte dei micobatteri ambientali è elevato, e diversi studi riportano che solo il 10% di tutti gli isolati polmonari sono associati a malattia e, quindi, clinicamente significativi. Pertanto, un'erronea valutazione del significato clinico implicherebbe non solo un trattamento inutile per il paziente, ma anche il perdere di vista la causa reale della malattia (Griffith 2007, Tortoli 2009).

Dati l'elevato numero di specie micobatteriche riconosciute, l'ampio spettro della virulenza dei NTM e la diversa suscettibilità dell'ospite, è improbabile che un solo insieme di criteri diagnostici possa essere utile o accurato per tutte le specie NTM in tutti i contesti clinici (Griffith 2007). Il sospetto clinico è il punto di partenza di una serie di procedure diagnostiche che prevedono il coinvolgimento di diverse discipline mediche e l'esecuzione di accurati esami patologici, immunologici e microbiologici. Il percorso per arrivare a una diagnosi definitiva può essere molto lungo e complesso, motivo per il quale la scoperta e lo studio di nuovi approcci e metodologie è essenziale per migliorare il processo diagnostico.

Terapia

Il trattamento delle infezioni causate da NTM è quasi sempre più complicato rispetto al trattamento della tubercolosi, a causa della varietà delle manifestazioni cliniche e delle specie coinvolte. Infatti, il tipo di farmaci, la frequenza di somministrazione e la durata della terapia variano in relazione alla specie che causa la malattia, al sito di infezione e alla gravità della malattia.

Sebbene alcuni farmaci antitubercolari siano attivi anche contro i NTM, il trattamento della maggior parte delle infezioni richiede antibiotici che non sono generalmente utilizzati nel trattamento della tubercolosi. La scelta degli antibiotici è strettamente legata all'esecuzione di test di suscettibilità ai farmaci dell'isolato riconosciuto come causa della malattia (www.thoracic.org).

Spesso è richiesta una terapia di lungo corso, anche della durata di 18-24 mesi, senza che questo garantisca la guarigione. Inoltre i farmaci sono spesso mal tollerati a causa di frequenti e pesanti effetti collaterali, al punto che spesso i pazienti lamentano che il trattamento è più gravoso della malattia. La decisione di trattare un paziente deve essere il risultato di una valutazione dei rischi legati alla progressione della malattia e di quelli legati alla tossicità dei farmaci; in relazione al tipo di malattia e alle condizioni generali del soggetto, un obiettivo ragionevole potrebbe essere rappresentato da cure palliative per i sintomi o da un rallentamento della progressione della malattia, più che non dalla sua completa eradicazione (Lettieri 2008, www.thoracic.org).

Spesso, accanto alla terapia farmacologica, è necessario ricorrere alla chirurgia. La rimozione chirurgica senza la terapia antimicobatterica è la pietra miliare nel trattamento delle linfadeniti da NTM, a differenza della linfadenite da MTB, per la quale la terapia antibiotica è prioritaria. Questo approccio è risolutivo in più del 90% dei casi nei bambini. La terapia basata sui farmaci antimicobatterici dovrebbe essere riservata a quelli con malattia ricorrente o a quelli per i quali non è possibile praticare la terapia chirurgica, e la scelta degli antibiotici dipende dalle specie NTM isolate (Jarembowski 2009).

La terapia chirurgica è raccomandata anche come ultima risorsa in tutti i casi di infezione polmonare localizzata dovuta a microrganismi resistenti ai farmaci (Moran 1983, Pomerantz 1991, Nelson 1998, Shiraishi 2002). Un trattamento chirurgico è

richiesto nei casi in cui vi è un accumulo di pus e presenza di tessuto morto ed è indicato nelle infezioni dovute a *M. fortuitum* e *M. chelonae* e in alcuni casi a *M. marinum*, insieme alla terapia antibiotica (Wallace 1990, Chow 1987).

Per quanto riguarda i costi associati al trattamento delle infezioni NTM, si stima che siano comparabili a quelli di altre infezioni croniche come l'HIV/AIDS (Ballarino 2009).

Isolamento e identificazione

L'accurata identificazione a livello di specie di un micobatterio è estremamente importante, e a tal fine, è necessario utilizzare le metodologie più opportune. L'utilizzo di terreni e/o condizioni colturali poco adatti può essere responsabile della perdita di patogeni significativi, mentre un'identificazione approssimativa può portare a sottovalutare o sopravvalutare il ruolo di un isolato. Inoltre, la corretta identificazione è alla base del corretto trattamento, in quanto il regime terapeutico per le infezioni dovute ad una specie micobatterica spesso non è efficace contro quelle causate da un'altra specie. (Tortoli 2009). L'esame batterioscopico e la coltura utilizzando terreni specifici sono la pietra miliare per l'identificazione dei micobatteri (Griffith 2014).

Esame batterioscopico

L'esame batterioscopico è costituito dall'osservazione di un vetrino del campione clinico del paziente mediante il microscopio ottico, previa opportuna colorazione. Se nel campione è presente un numero sufficiente di micobatteri, questa procedura rappresenta il sistema più rapido per il rilevamento dei micobatteri nei campioni clinici. E' stato stimato che sono necessari almeno 10^5 organismi/ml nel campione per il rilevamento mediante colorazione in un vetrino. La colorazione di Gram non è adatta per i micobatteri, a causa dell'elevato contenuto lipidico della loro parete batterica, per cui si ricorre alla colorazione acido-alcol resistente. Due procedimenti sono generalmente utilizzati per questo tipo di colorazione: i metodi che utilizzano la carbolfucsina, comprendenti le metodiche di Ziehl-Neelsen e di Kinyoun, e un metodo fluorocromatico che utilizza come coloranti auramina O o auramina-rodamina (Schlossberg 1999). Le colorazioni di Ziehl-Neelsen e di Kinyoun differiscono nel principio della colorazione. La prima procedura prevede il riscaldamento della fucsina affinché penetri nella parete della cellula micobatterica. Il secondo è un metodo di colorazione "a freddo", in cui la soluzione di fucsina contiene una maggiore percentuale di fenolo per incrementare la penetrazione nella parete cellulare. Entrambi i metodi colorano i micobatteri in rosso su fondo azzurro dato dal colorante di contrasto blu di metilene. I vetrini colorati devono essere osservati utilizzando un obiettivo a immersione in olio a 100X (Schlossberg 1999).

La colorazione con auramina O permette la visione dei micobatteri come giallo brillanti su uno sfondo scuro, utilizzando un obiettivo a 25X. Modificazioni della tecnica con auramina O includono l'uso della rodamina, che conferisce alle cellule un aspetto dorato. L'auramina-rodamina è la procedura di elezione per i campioni clinici, poiché ha il vantaggio di essere più sensibile rispetto alle tecniche a base di carbolfucsina (Ulukanligil M 2000, Somoskovi 2001).

Uno svantaggio comune a queste tecniche è che non discriminano tra organismi vitali e non vitali. Inoltre, colorazioni effettuate in modo non ottimale possono dare risultati falsi positivi con organismi non appartenenti al genere *Mycobacterium* e appartenenti ai generi *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Cryptosporidium*, *Isospora* e *Ciclospora*. Pertanto non è possibile fare diagnosi di malattia basandosi esclusivamente sull'esame batterioscopico (Schlossberg 1999).

Esame colturale

La maggior parte dei NTM può essere coltivata sui comuni terreni di coltura per micobatteri. I terreni solidi maggiormente utilizzati sono il Lowenstein-Jensen, il Dubos Agar e le diverse varianti del Middlebrook (Wallace 1990). I terreni liquidi sono più sensibili rispetto ai terreni solidi, sebbene la loro sensibilità sia inferiore al 100%. Inoltre alcuni di essi sono abbinati a sistemi di lettura automatizzata, basati sull'utilizzo di determinate sostanze presenti nel mezzo da parte dei micobatteri e su un rilevatore di tale utilizzo, che rendono più semplice l'individuazione delle colture positive; i sistemi maggiormente utilizzati comprendono il BACTEC MGIT (BD Diagnostics), il Septi-check (BD Diagnostics), il MB Redox (Heipha Diagnostika) e il MB/BacT (Organon-Teknika) (Somoskovi 1999).

Dal momento che si ritiene che la più elevata possibilità di ritrovamento dei NTM si abbia se l'inoculo viene effettuato sia sui terreni solidi che su quelli liquidi (Griffith 2014), le linee guida suggeriscono l'inoculo dei campioni almeno su un terreno solido e su uno liquido (Subcommittee 1999).

Prima di procedere all'inoculo è necessario procedere a una digestione-decontaminazione dei campioni non sterili al fine di eliminare i batteri comuni e i funghi che prenderebbero il sopravvento nei terreni di coltura, impedendo la crescita dei micobatteri (Griffith 2014); il procedimento determina anche la fluidificazione dei materiali, con conseguente liberazione dei micobatteri presenti all'interno delle cellule.

Esistono numerosi metodi, tra i quali quello attualmente raccomandato per il recupero dei NTM è quello basato sull'utilizzo di Na-OH-N-acetyl-L-cisteina (Buijtelts 2005, Ferroni 2006, Ricaldi 2008).

Spesso i terreni vengono supplementati con antibiotici per inibire la crescita di eventuali contaminanti o con sostanze che incrementano il tasso di crescita o addirittura sono indispensabili per la sopravvivenza; infatti, alcuni micobatteri hanno esigenze nutrizionali particolari: *M. haemophilum* richiede emina che può essere ottenuta dal terreno agar cioccolato o da un supplemento di citrato di ammonio ferrico, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. genavense* richiedono l'aggiunta nei terreni di mycobactina; *M. ulcerans* cresce meglio in terreni arricchiti con tuorlo d'uovo (Griffith 2007, Samra 1999, Katoch 2004).

La temperatura di incubazione deve essere modulata sul tipo di campione e sulla base dei microrganismi che si sospetta possano essere presenti: 35-37 °C per la maggior parte dei patogeni, 30 °C per *M. ulcerans*, 30-32 °C per *M. haemophilum*, 31-33 °C per *M. marinum*; 42-45 °C per *M. xenopi*. (Wolinski 1992, Samra 1999, Katoch 2004).

Le linee guida consigliano di incubare i campioni di cute a temperatura normale e a temperatura ambiente, e alcuni autori suggeriscono di incubare a due differenti temperature tutti i campioni clinici al fine di ottimizzare il ritrovamento di micobatteri (Griffith 2007).

I NTM a crescita rapida si sviluppano generalmente entro una settimana dall'inoculo, mentre la maggior parte dei NTM richiede tra le 2 e le 3 settimane di incubazione, e *M. genavense* e *M. ulcerans* possono richiedere 8-12 settimane; in tutti i casi i tempi possono variare in relazione alla carica eventualmente presente nel campione (Griffith 2007).

L'identificazione a livello di specie dei micobatteri non tubercolari cresciuti in coltura è estremamente importante, dal momento che da essa dipendono la diagnosi e la terapia. Ovviamente è indispensabile escludere prima con certezza che si tratti di *Mycobacterium tuberculosis* complex, per le implicazioni cliniche e terapeutiche che questo comporta. Una volta accertato che si tratta di un NTM, per l'identificazione di specie possono essere utilizzati i test biochimico-colturali, l'analisi cromatografica dei lipidi di parete, le sonde molecolari, il sequenziamento genico e la PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), indicata

anche con l'acronimo PRA (PCR-RFLP Analysis) (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap8, Katoch 2004).

Test biochimico-colturali

L'utilizzo dei test colturali e biochimici si basa sull'analisi di alcune caratteristiche colturali, quali velocità di crescita, morfologia e pigmentazione delle colonie, e di caratteristiche biochimiche legate generalmente alla capacità di utilizzo di determinati substrati. Le procedure per l'esecuzione dei test sono complesse, laboriose e richiedono anche diverse settimane, il che rende problematico ottenere una diagnosi di specie in tempi brevi (Kim 2005).

Inoltre, a causa del numero estremamente elevato delle specie NTM, è necessaria l'esecuzione di un numero notevole di test, con conseguente dispendio di tempo e mezzi, mentre i risultati il più delle volte non sono risolutivi. Infatti, solo per le specie di più frequente isolamento sono conosciuti i risultati attesi, con la conseguenza che l'identificazione risulterebbe corretta qualora il microrganismo appartenesse ad una di queste specie, che rappresentano tuttavia un'esigua minoranza, mentre sarebbe errata qualora appartenesse ad una delle specie isolate con meno frequenza. E' evidente che si tratta di un approccio del tutto inadeguato in rapporto al numero sempre crescente di specie scoperte e riconosciute e pertanto è stato quasi completamente abbandonato (Dai 2011, Kim 2005, Roth 2000, Springer 1996).

Analisi cromatografica dei lipidi di parete

Nella parete dei micobatteri sono presenti acidi grassi a catena lunga detti acidi micolici, i quali possono essere estratti e analizzati mediante HPLC (cromatografia su liquido a elevata prestazione); il risultato sono dei traccianti specie-specifici che confrontati con traccianti di riferimento permettono l'identificazione del micobatterio in esame (Butler 1991, Butler 2001).

Gli acidi micolici caratteristici delle pareti dei micobatteri sono sette, dei quali la maggior parte delle specie ne presenta due o tre tipi diversi. La conseguenza è che il numero delle combinazioni non è abbastanza elevato da essere specie-specifico, pertanto attraverso questa metodica non è possibile l'identificazione univoca di tutte le specie (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap8).

Sonde molecolari

Le sonde molecolari, conosciute anche con il termine inglese DNA-*probe* sono state utilizzate per l'identificazione dei micobatteri dall'inizio degli anni Novanta. Si tratta di strumenti molto efficaci costituiti da una sonda costituita da DNA a singola catena avente sequenza specie-specifica e opportunamente marcata, la quale è in grado di legarsi con l'rRNA dell'organismo target e formare un ibrido DNA-rRNA stabile. Dopo la degradazione chimica delle sonde non ibridizzate, il marcatore presente sull'ibrido DNA-rRNA è rilevato attraverso un sistema specifico per ciascun kit. Questi sistemi sono utilizzabili a partire da organismi cresciuti in coltura e si sono dimostrati altamente sensibili e specifici e consentono di ottenere i risultati in tempi brevi (Musial 1988). Esistono quattro sistemi di identificazione basati sulle sonde molecolari: AccuProbe (Gen-Probe BioMérieux), per l'identificazione di *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae* (Lebrun 1992); GenoType Mycobacterium, con due versioni che permettono rispettivamente l'identificazione di *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. interjectum*, *M. xenopi*, *M. chelonae*/*M. immunogenum*, *M. abscessus*/*M. immunogenum*, *M. scrofulaceum/paraffinicum*, *M. marinum/ulcerans*, *M. fortuitum*/*M. mageritense*, *M. malmoense*/*M. haemophilum*/*M. palustre*/*M. nebraskense*, *M. peregrinum*/*M. alvei*/*M. septicum* e di *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. heckehornense*, *M. lentiflavum*, *M. phlei*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*, *M. haemophilum*/*M. nebraskense* (Hein) (Russo 2006); GenoType MTBC, per la differenziazione di specie entro il *Mycobacterium tuberculosis* complex (Hein) (Richter 2003); INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetics), che permette di identificare *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* complex, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. chimaera*, *M. genavense*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. kansasii* genotipo I, *M. kansasii* genotipo II, *M. kansasii* genotipo III/IV/V/*M. gastri* (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap8). Nel corso degli anni il numero di specie differenziabili con le sonde molecolari è aumentato significativamente, tuttavia è ancora limitato; inoltre non sono pochi i casi in cui la sonda non permette di arrivare all'identificazione univoca della specie. Purtroppo i costi sono piuttosto elevati, il che limita il loro utilizzo ai laboratori con maggiori disponibilità economiche.

Sequenziamento genico

La regione genica più comunemente sequenziata per l'identificazione dei NTM è il gene codificante per il rRNA 16S (Rogall 1990, Edwards 1989) e il sequenziamento di questo gene è riconosciuto come il metodo di riferimento per l'identificazione dei micobatteri (Kirschner 1993, Roth 2000).

Altre regioni idonee si trovano nel gene *hsp65*, che codifica per le proteine da shock termico da 65 kD, nella regione spaziatrice (ITS), interposta fra i geni per il rRNA 16S e 23S, e nel gene *rpoB* codificante per la subunità β della RNA-polimerasi (Kirschner 1992, Roth 1998, Adékambi 2003, McNabb 2004). L'identificazione del microrganismo in esame si raggiunge confrontando la sequenza ottenuta con quelle presenti nei database, alcuni dei quali commerciali, altri consultabili gratuitamente tramite Internet; tra questi: GenBank, EMBL, DDBJ, RIDOM. Il database fornisce una serie di microrganismi in ordine decrescente di somiglianza con il ceppo in esame, riportandone le sequenze e le eventuali discordanze. Non è scontato che l'identificazione corrisponda alla specie con il più elevato grado di somiglianza: è essenziale l'esperienza del microbiologo per valutare le discrepanze e giungere alla corretta identificazione; solo quando si è di fronte al 100% di omologia con una specie nota, l'identificazione può considerarsi certa (Rogall 1990, www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap8).

In generale, il sequenziamento genico è un metodo molto efficace per l'identificazione dei micobatteri a livello di specie, ma richiede una strumentazione specializzata e tempi di esecuzione piuttosto lunghi, e presenta inoltre dei costi elevati, per cui è difficile renderla una pratica di routine nella maggior parte dei laboratori diagnostici (Telenti 1993, Roth 2000, Katoch 2007).

PCR-RFLP (PRA)

Nel genoma micobatterico sono presenti sequenze altamente conservate e specifiche per il genere *Mycobacterium* o per un dato raggruppamento di esso, le quali presentano tuttavia una certa variabilità interspecifica. I saggi PCR-RFLP si basano sull'amplificazione di una di queste regioni comuni tramite PCR, seguita da una digestione con endonucleasi di restrizione che permetta l'identificazione a livello di specie o di gruppo.

Il potere discriminante di queste tecniche si basa sulla scelta di sequenze target che seppure conservate sono caratterizzate da una buona variabilità interspecifica, e da una elevata stabilità intraspecifica, e di enzimi di restrizione che permettano di ottenere pattern, per quanto è possibile, specifici per ciascuna specie (Roth 2000). Tra le sequenze più conosciute e studiate vi sono il gene *hsp65* che codifica per le proteine da shock termico da 65 kD e la regione che codifica per il rRNA, con i geni *16S rRNA*, *23S rRNA* e la regione interna spaziatrice (ITS) *16S-23S rRNA* (Plikaytis 1993, Telenti 1993, Hughes 1993, Domenech 1994, Lappayawichit 1996, Roth 2000, Kim 2005, Katoch 2007). Altre sequenze includono i geni *rpoB* (Kim 2001, Shima 2015), *dnaJ* (Takewaki 1994), *gyrB* (Kasai 2000), *rpoV* (Comincini 1998), *oxyR* (Sreevatsan 1996), *SecA 1* (Zelazny 2005), *hupB* (Prabhakar 2004).

Numerosi protocolli sono stati messi a punto utilizzando porzioni differenti di queste sequenze e differenti enzimi di restrizione, i quali permettono di ottenere con semplicità e rapidità profili di restrizione specifici per un numero variabile di specie micobatteriche o per gruppi di specie. Tuttavia alcuni loci non sono presenti in tutte le specie o non sono sufficientemente discriminanti per differenziare tra specie strettamente correlate e il successo nell'identificare con accuratezza le singole specie attraverso l'analisi del pattern di restrizione è piuttosto variabile.

Una limitata variabilità interspecifica della sequenza genica determina la possibilità che diverse specie presentino un identico pattern indipendentemente dagli enzimi di restrizione utilizzati, con la conseguenza che non è possibile l'identificazione a livello di specie per alcuni micobatteri. Le implicazioni possono essere rilevanti, perché talvolta il profilo di restrizione è il medesimo per specie riconosciute come patogene e altre che non lo sono in nessun caso (Roth 1998, Roth 2000, Katoch 2007).

Un ulteriore problema è legato alla variabilità intraspecifica della sequenza genica. Quando questa è elevata, la conseguenza è l'esistenza di più profili di restrizione per una stessa specie, il che porta a un'identificazione certa solo quando il pattern è conosciuto. Un profilo sconosciuto potrebbe essere dovuto al fatto che il micobatterio appartiene a una specie diversa da quelle prese in considerazione per lo sviluppo dell'algoritmo oppure ad una specie studiata, ma dal profilo non codificato: in entrambi i casi l'identificazione a livello di specie risulta impossibile (Telenti 1993, Roth 2000).

In alcuni casi la sequenza target è tale per cui la lunghezza degli ampliconi è piuttosto piccola e la successiva analisi di restrizione determina la formazione di frammenti le cui

dimensioni possono essere confuse con dimeri di primers o richiedere l'utilizzo di gel di agarosio a elevata risoluzione (MetaPhor® Agarose, NuSieve® Agarose), l'utilizzo della poliacrilamide o sistemi di analisi computerizzata (Katoch VM 2007; Mandira 2013).

In altri casi le difficoltà sono legate soprattutto al fatto che i pattern di restrizione di diverse specie sono identici o presentano differenze di poche basi, il che rende critica un'accurata identificazione (Kim 2005; Brunello 2001, Varma-Basil 2013). Anche in questo caso può essere necessario ricorrere ai gel di agarosio a elevata risoluzione (MetaPhor® Agarose, NuSieve® Agarose, poliacrilamide) o all'ausilio dei sistemi di analisi computerizzata (Varma-Basil 2013). Occorre tuttavia sottolineare che solo questi ultimi sono in grado di fornire una corretta interpretazione dei profili di restrizione, mentre il ricorso ai gel ad elevata risoluzione si rivela efficace solo in pochi casi. Ciò rende tali protocolli di difficile applicazione nei laboratori dotati di limitati mezzi tecnologici ed economici.

In generale, le metodiche PCR-RFLP sono caratterizzate da semplicità e rapidità di esecuzione, sono economiche e consentono di ottenere un'identificazione di specie entro pochi giorni dall'isolamento del ceppo, per cui possono essere considerate come applicabili di routine virtualmente in tutti i contesti diagnostici (Brunello 2001, Kim 2005; Mandira 2013).

Alcuni autori suggeriscono inoltre che i laboratori che intendono adottare le tecniche PCR-RFLP dovrebbero elaborare dei propri algoritmi sulla base delle specie isolate più frequentemente (Brunello 2001).

Scopo del lavoro

L'identificazione a livello di specie dei micobatteri non tubercolari isolati è estremamente importante, dal momento che da essa dipendono la diagnosi e la terapia.

L'approccio tradizionale basato sull'analisi di caratteristiche colturali e metaboliche degli isolati clinici è diventato nel tempo del tutto inadeguato in rapporto al numero sempre crescente di specie scoperte e riconosciute e alla necessità di una diagnosi in tempi brevi, e pertanto è stato quasi completamente abbandonato (Roth 2000, Dai 2011). Nel contempo, altre metodiche sono state sviluppate e adottate in diversi contesti per rendere l'identificazione di specie un processo affidabile e al tempo stesso rapido.

L'analisi dei lipidi di parete è una tecnica che può essere applicata solo su isolati in coltura e non consente un'identificazione specie-specifica, a causa del fatto che i diversi pattern sono comuni a più specie (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap8).

Le sonde molecolari sono strumenti altamente sensibili e specifici, sebbene non permettano l'identificazione univoca per tutte le specie. Permettono di ottenere risultati in tempi brevi, ma sono utilizzabili quasi esclusivamente su isolati colturali. Inoltre sono molto costose, il che non consente il loro utilizzo di routine nella maggior parte dei laboratori diagnostici (www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap8, Musial 1988).

Il sequenziamento genico è un metodo molto valido per l'identificazione di specie dei micobatteri, sebbene i risultati varino in rapporto al grado di polimorfismo dei geni utilizzati come target; inoltre può essere eseguito solo su isolati clinici e richiede tempi di esecuzione piuttosto lunghi; la necessità di una strumentazione specializzata e i costi elevati ne fanno una tecnica la cui applicazione è limitata a un numero ristretto di laboratori (Telenti 1993, Roth 2000, Katoch 2007).

La PCR-RFLP è indubbiamente la metodica più utilizzata e studiata, in quanto è un sistema semplice, rapido ed economico per l'identificazione delle specie micobatteriche (Kim 2005). Nel corso degli anni sono stati elaborati numerosi protocolli utilizzando target differenti, al fine di ottenere una capacità discriminante sempre maggiore e al tempo stesso una semplicità di utilizzo che li renda applicabili nei contesti diagnostici più svariati. I risultati nel fornire profili di restrizione specie-specifici di semplice interpretazione sono piuttosto variabili e dipendono da un lato dalla diversità interspecifica e intraspecifica che caratterizza il gene utilizzato come target e dall'altro

da un'accurata scelta degli enzimi di restrizione (Plikaytis 1993, Telenti 1993, Hughes 1993, Domenech 1994, Takewaki 1994, Lappayawichit 1996, Sreevatsan 1996, Comincini 1998, Kasai 2000, Roth 2000, Kim 2001, Prabhakar 2004, Kim 2005, Zelazny 2005, Katoch 2007, Shima 2015).

Per questi motivi numerosi studi sono volti all'individuazione di nuove sequenze geniche e alla elaborazione di nuovi protocolli che permettano di superare i limiti di quelli attualmente esistenti (Takewaki 1993, Soini 1994, Gingeras 1998, Kim 1999, Kasai 2000, Zelazny 2005, Mignard 2007, Yamada-Noda 2007, Mignard 2008).

Recentemente, uno studio comparativo sul genoma di numerose specie micobatteriche ha messo in evidenza l'esistenza di nuovi loci adatti per l'identificazione di specie dei micobatteri; questi sono costituiti da due regioni omologhe comuni a tutti i micobatteri, generalmente indicate con l'acronimo inglese CHRs (Common homologous regions), la cui lunghezza è superiore alle 300 bp, separate da brevi regioni non conservate di lunghezza inferiore alle 200 bp (Dai 2011).

Il locus *dnaK* è stato segnalato come particolarmente adatto a tale scopo, poiché nella costruzione di un albero filogenetico si è dimostrato più affidabile e discriminante rispetto al gene *hsp65*, tra i più utilizzati per l'elaborazione di tecniche per l'identificazione di specie del genere *Mycobacterium*.

Il gene *dnaK* è un gene housekeeping che codifica per una heat shock protein, Hsp70, ed è altamente conservato in tutti gli organismi. Il locus *dnaK* segnalato nello studio e utilizzato per la costruzione dell'albero filogenetico è costituito da una parte del gene omonimo, comprendente una regione variabile di 181 bp e parte delle regioni omologhe comuni fiancheggianti, per una lunghezza complessiva di 451 bp (Dai 2011).

Visto l'elevato potere discriminante, il locus *dnaK* si presentava come un nuovo target ideale per lo studio di una metodica per l'identificazione dei micobatteri a livello di specie che fosse maggiormente discriminatoria rispetto a quelle attualmente esistenti.

Pertanto lo scopo di questo lavoro era l'elaborazione di un nuovo algoritmo basato sulla tecnica PCR-RFLP avente come target il locus *dnaK*, caratterizzato quindi, almeno in via potenziale, da un maggior potere discriminante; un altro obiettivo era che i profili generati dalla digestione con gli enzimi di restrizione fossero per quanto possibile specie-specifici e presentassero differenze tali da poter essere facilmente riconoscibili attraverso la semplice visualizzazione in gel di agarosio. Una metodica con queste

caratteristiche sarebbe al tempo stesso affidabile e di semplice utilizzo in ogni contesto diagnostico.

Un limite di tutti i protocolli PCR-RFLP, nonché della quasi totalità delle tecniche per l'identificazione di specie dei micobatteri, è che possono essere utilizzati solo su isolati clinici e sebbene alcuni autori ipotizzino la possibilità di applicare la tecnica anche ai campioni clinici (Plikaytis 1992, Telenti 1993, Varma-Basil 2013), non sono mai stati condotti studi a riguardo. Pertanto, laddove fosse possibile la realizzazione di un nuovo protocollo PCR-RFLP basato sul locus *dnaK*, un ulteriore obiettivo di questo studio sarebbe la valutazione della sua applicabilità ai campioni clinici, che consentirebbe di ridurre notevolmente i tempi per formulare una diagnosi microbiologica presuntiva, soprattutto in caso di esame batterioscopico negativo.

Materiali e metodi

Ceppi micobatterici

In questo studio sono stati analizzati/utilizzati 33 ceppi di riferimento e 58 isolati clinici appartenenti a 30 specie micobatteriche (Tabb. 1, 2).

Tutti gli isolati clinici sono stati preventivamente sottoposti a identificazione a livello di specie attraverso una serie di metodi molecolari: una PCR-RFLP avente come target un frammento di 441 bp del gene *hsp65* (Brunello, 2001), una PCR-RFLP avente come target il gene spaziatore 16S-23S (rRNA) (Roth, 2000) eseguite nel nostro laboratorio e il sequenziamento del gene per la subunità ribosomale 16S (rDNA) (Rogall, 1990), eseguito da una ditta esterna e per lo studio sono stati utilizzati solo gli isolati per i quali l'attribuzione di specie era assolutamente priva di incertezza.

Specie	Ceppo di riferimento
<i>M. abscessus</i>	ATCC 19977
<i>M. africanum</i>	ATCC 25420T
<i>M. asiaticum</i>	ATCC 25276T
<i>M. avium</i>	ATCC 25291T
<i>M. bovis</i>	ATCC 19210T
<i>M. celatum</i>	ATCC 51131T
<i>M. chelonae</i>	ATCC 14472
<i>M. chelonae</i>	ATCC 35752T
<i>M. fallax</i>	ATCC 35219
<i>M. flavescens</i>	ATCC 14474T
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 35931T
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 6841T
<i>M. gastri</i>	ATCC 15754T
<i>M. gordonae</i>	ATCC 35758
<i>M. haemophilum</i>	ATCC 29548T
<i>M. hiberniae</i>	ATCC 49874T
<i>M. interjectum</i>	ATCC 51457T
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950T
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478T
<i>M. malmoense</i>	ATCC 29571T
<i>M. marinum</i>	ATCC 927
<i>M. neoaurum</i>	ATCC 25975T
<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530T
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981T
<i>M. shimoidei</i>	ATCC 27962T
<i>M. simiae</i>	ATCC 25273
<i>M. simiae</i>	ATCC 25275T
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 19420T
<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799T
<i>M. tokaiense</i>	ATCC 27282T
<i>M. triviale</i>	ATCC 23292T
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv
<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483T

Tab.1 - Ceppi micobatterici di riferimento utilizzati nello studio

Specie	Numero di isolati
<i>M. abscessus</i>	3
<i>M. africanum</i>	1
<i>M. avium</i>	12
<i>M. bovis</i>	2
<i>M. chelonae</i>	6
<i>M. fortuitum</i>	2
<i>M. goodii</i>	10
<i>M. intracellulare</i>	3
<i>M. kansasii</i>	4
<i>M. marinum</i>	2
<i>M. scrofulaceum</i>	1
<i>M. simiae</i>	1
<i>M. szulgai</i>	1
<i>M. tuberculosis</i>	10

Tab.2 - Isolati clinici micobatterici utilizzati nello studio

Estrazione del DNA da isolati clinici

I ceppi di riferimento e gli isolati clinici sono stati inoculati in terreno solido Lowenstein-Jensen e in terreno liquido 7H9 addizionato con ADC e incubati alla temperatura più adatta alla crescita di ciascuna specie. Successivamente, il DNA micobatterico è stato estratto dalle colonie cresciute sui terreni solidi o dalle colture liquide. Dai terreni solidi le cellule batteriche sono state raccolte con un'ansa e risospese in un ml di TE, mentre per le colture liquide, è stato prelevato un ml di coltura; in entrambi i casi le sospensioni sono state inattivate a 80 °C per 10 minuti, centrifugate per 10 minuti a 10 000 giri e il pellet successivamente è stato risospeso in 100 µl di TE. Le sospensioni risultanti sono state bollite per 5 minuti, e successivamente centrifugate per 2 minuti a 14 000 rpm; infine è stato raccolto il surnatante, contenente il DNA genomico. Questo è stato utilizzato immediatamente o conservato a -20 °C.

Amplificazione PCR per il locus dnaK

Il target dell'amplificazione era rappresentato da un frammento di 451 bp del gene dnaK. Il set di primer utilizzato era costituito dal forward primer dnaKF₁, con sequenza 5'-

CTGACCAAGGACAAGATGGC-3' e dal reverse primer dnaKR_r, con sequenza 5'-TCGATCAGCTTGGTCATCAC-3' (Dai 2011). La mix di reazione era costituita da un volume complessivo di 50 µl, contenente una concentrazione di ciascun primer pari a 0.5 µM, una concentrazione di ciascun desossiribonucleoside trifosfato pari a 200 µM, 0.5 U di HOT START Taq polimerasi (Qiagen) in 1x di buffer e 5 µl di DNA precedentemente estratto.

Il programma di amplificazione era il seguente: 95 °C per 15 min, seguito da 40 cicli di 95 °C per 30 s, 55 °C per 30 s, 72 °C per 30 s e infine 72 °C for 2 min.

Il risultato dell'amplificazione è stato valutato mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, utilizzando come marker di corsa un DNA ladder da 50 bp e uno da 100 bp.

In ogni seduta è stata utilizzata acqua distillata sterile come controllo negativo e il ceppo di riferimento di *M. avium* ATCC 25291T come controllo positivo.

Sequenziamento del DNA e scelta degli enzimi di restrizione

I prodotti amplificati sono stati sequenziati direttamente utilizzando gli stessi primer utilizzati nell'amplificazione. Il sequenziamento è stato eseguito da una ditta esterna.

Le sequenze geniche degli ampliconi sono state analizzate e confrontate mediante il programma CodonCode Aligner per scegliere gli enzimi di restrizione più adatti alla costruzione di un algoritmo per l'identificazione delle singole specie.

RFLP

Gli ampliconi sono stati sottoposti all'analisi di restrizione con gli enzimi Fau I and BstMW I. La mix di digestione era costituita da 10 µl del prodotto di amplificazione, 0,2 µl (2 U) di ciascun enzima, e 2 µl di buffer di restrizione (5X buffer) e acqua distillata sterile per un volume complessivo di 20 µl. La digestione è stata eseguita per due ore a 37 °C per l'enzima Fau I e a 55 °C per l'enzima BstMW I. Dopo la digestione, i prodotti di digestione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 4% e i frammenti visualizzati con colorazione con gel red e illuminazione con raggi UV. Per interpretare i profili di restrizione di ciascuna specie, sono stati utilizzati come marker di corsa un DNA ladder da 50 bp e uno da 100 bp.

Valutazione dell'accuratezza e dell'affidabilità della tecnica

45 isolati clinici sono stati sottoposti ad identificazione di specie in cieco, sia mediante la metodica sviluppata, sia mediante altre tecniche molecolari (Brunello 2001, Roth 2000, Rogall 1990).

Estrazione del DNA da campioni clinici

L'estrazione del DNA è stata eseguita con modalità diverse in relazione al tipo di campione clinico.

Gli espettorati, gli aspirati bronchiali e gastrici e le urine sono stati sottoposti a digestione-decontaminazione secondo protocolli standard basati sull'utilizzo di Na-OH-N-acetyl-L-cisteina (Buijtelts 2005, Ferroni 2006, Ricaldi 2008). Successivamente è stato prelevato un ml, inattivato a 80 °C per 10 minuti, centrifugato a 10 000 rpm per 10 minuti e il pellet risospeso in 100 µl di TE. La sospensione è stata bollita per 5 minuti, e successivamente centrifugata per 2 minuti a 14 000 rpm; infine è stato raccolto il surnatante, contenente il DNA genomico.

Per il sangue e i liquidi pleurici e sinoviali non è stato necessario ricorrere alla decontaminazione-digestione ed è stato prelevato direttamente un ml di campione. Le fasi successive sono quelle descritte per gli espettorati.

Le biopsie e i linfonodi sono stati finemente sminuzzati, risospesi in 500 µl di PBS e incubati con proteinasi K in concentrazione pari a 100 µg/ml a 56 °C per 8 ore. Successivamente la sospensione è stata centrifugata per 10 minuti a 10 000 e il pellet risospeso in 100 µl di TE. Le fasi successive sono quelle descritte per gli espettorati.

Amplificazione PCR per il locus *dnaK* nei campioni clinici.

Il protocollo di amplificazione prevedeva una mix di reazione preparata secondo le modalità descritte per i ceppi e gli isolati clinici e un identico programma di amplificazione.

RFLP nei campioni clinici

Il protocollo di digestione per gli ampliconi ottenuti dai campioni clinici era il medesimo utilizzato nella digestione degli ampliconi ottenuti dai ceppi e dagli isolati clinici.

Valutazione della sensibilità della tecnica

Per valutare la sensibilità della tecnica sugli isolati clinici, 45 diluizioni scalari di colture micobatteriche la cui concentrazione finale era pari a 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml sono state sottoposte a estrazione del DNA, il quale è stato usato come template per la PCR con i primers dnaKF₁ e dnaKR₁. Successivamente gli ampliconi sono stati sottoposti a digestione enzimatica con gli enzimi Fau I e BstMW I.

Per valutare la sensibilità della tecnica sui campioni clinici, sono stati utilizzati 24 campioni di espettorato di donatori volontari, senza sintomi clinici, nei quali si è accertata l'assenza di micobatteri attraverso l'esame batterioscopico; i campioni sono stati successivamente infettati sperimentalmente con diluizioni seriali di colture micobatteriche, la cui concentrazione finale era pari a 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml; i campioni sono stati successivamente sottoposti ad estrazione del DNA, il quale è stato usato come template per la PCR con i primer dnaKF₁ e dnaKR₁. Successivamente gli ampliconi sono stati sottoposti a digestione enzimatica con gli enzimi Fau I e BstMW I. Prima di procedere all'infezione sperimentale, un'aliquota dei campioni di espettorato è stata utilizzata per l'esame colturale, al fine di escludere con certezza la presenza di micobatteri interferenti.

Inoltre sono stati sottoposti ad amplificazione e successiva digestione enzimatica 40 campioni clinici caratterizzati da esame batterioscopico positivo per BAAR o caratterizzati da esame batterioscopico negativo per BAAR, ma risultati positivi all'esame colturale.

Valutazione della specificità della tecnica

Per valutare la specificità della tecnica, ceppi di riferimento e isolati clinici appartenenti a generi diversi dal genere *Mycobacterium* sono stati sottoposti a estrazione del DNA, il quale è stato usato come template per la PCR con i primer dnaKF₁ e dnaKR₁.

Risultati

In questo studio, 33 ceppi di riferimento e 58 isolati clinici appartenenti al genere *Mycobacterium* sono stati utilizzati per sviluppare una tecnica PCR-RFLP per l'identificazione dei micobatteri a livello di specie, avente come target una sequenza dai 451 bp del gene *dnaK* (Dai 2011) (Tabb 1, 2).

I primer utilizzati, dnaKF₁ e dnaKR₁, disegnati per le regioni fiancheggianti la sequenza target, e le condizioni di amplificazione hanno permesso di osservare nel gel di agarosio utilizzato per valutare l'avvenuta amplificazione, un'unica banda di dimensioni pari a 491 bp, corrispondente al target scelto, mentre non sono state osservate bande corrispondenti all'amplificazione di sequenze diverse, ai primer o alla formazione di dimeri di primer.

Questo target è stato amplificato in tutti i ceppi e gli isolati clinici appartenenti al genere *Mycobacterium*, mentre non è stato amplificato nei ceppi batterici appartenenti ad altri generi.

Tutti gli ampliconi risultanti sono stati sequenziati e le sequenze ottenute sono state analizzate con il software CodonCode Aligner per trovare gli enzimi di restrizione più adatti ad ottenere pattern RFLP specie-specifici che fossero al tempo stesso altamente discriminatori e in cui i frammenti di DNA avessero dimensioni tali da poter essere stimate attraverso la semplice osservazione del gel di agarosio. Attraverso questo programma è stato possibile analizzare tutti gli enzimi di restrizione commercialmente disponibili e valutare i pattern generati in ogni singolo ceppo.

Inoltre, sebbene non fosse mai stata osservata la formazione di dimeri di primer nel corso della PCR, nella valutazione dei profili di restrizione generati dai diversi enzimi non si è tenuto conto dei frammenti aventi una lunghezza inferiore a 50 bp.

Tra questi sono stati scelti Fau I e BstMWI, dal momento che erano quelli che fornivano i pattern più adatti ai nostri scopi, per cui sono stati utilizzati per la creazione di un algoritmo per l'interpretazione delle analisi di restrizione (Tab. 3).

Fau I	Specie	BstMW I
59-92-108-174	<i>M. celatum</i>	73-106-223
83-135-137	<i>M. neoaurum</i>	50-105-161-163
84-135-157	<i>M. nonchromogenicum</i>	106-296
90-114-176	<i>M. marinum</i>	50-59-97-190
71-90-108-174	<i>M. gastri</i>	106-296
71-108-266	<i>M. kansasii</i>	106-296;106-324
71-114-266	<i>M. kansasii</i>	106-296;106-324
92-135-194	<i>M. hiberniae</i>	106-296
92-149-205	<i>M. chelonae</i>	101-106-223
	<i>M. abscessus</i>	73-106-223
108-149-163	<i>M. vaccae</i>	106-133-138
129-135-149	<i>M. flavescens</i>	106-161-163
134-137-149	MTB complex	106-324
134-137-163	<i>M. fallax</i>	106-138-161
134-137-169	<i>M. fortuitum</i>	106-296
	<i>M. tokaiense</i>	106-324
134-137-194	<i>M. malmoense</i>	97-106-190
	<i>M. interjectum</i>	106-122-190
	<i>M. asiaticum</i>	106-138-190
	<i>M. haemophilum</i>	106-324
134-286	<i>M. triviale</i>	106-138-161
134-163-194	MAC	(50-)101-106-223;(50-)106-296
134-306	<i>M. fortuitum</i>	106-296
137-149-161	<i>M. smegmatis</i>	106-133-163
160-331	<i>M. simiae</i>	97-106-190
194-263	<i>M. szulgai</i>	101-106-190
194-297	<i>M. shimoidei</i>	73-106-163
202-289	<i>M. scrofulaceum</i>	101-106-223
205-241	<i>M. chelonae</i>	101-106-243
	<i>M. abscessus</i>	73-106-243
205-286	<i>M. gordonae</i>	50-106-296

Tab.3 Algoritmo per l'identificazione delle specie micobatteriche.

L'endonucleasi Fau I è stata scelta come enzima di prima linea dal momento che era in grado di produrre i pattern RFLP maggiormente discriminatori (Tab.3).

Fau I ha generato profili unici per 17 delle 30 specie, risultando così sufficiente per l'identificazione a livello di specie. Le restanti 13 specie potevano essere divise in cinque gruppi, ognuno dei quali presentava lo stesso profilo: il primo comprendeva *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* e *M. bovis*, il secondo *Mycobacterium avium* e *M. intracellulare*, il terzo *M. chelonae* e *M. abscessus*, il quarto alcuni sequevar di *M.*

fortuitum e *M. tokaiense*, e il quinto *M. asiaticum*, *M. malmoense*, *M. interjectum*, *M. haemophilum*. Per questi gruppi è stato necessario ricorrere a un'ulteriore analisi di restrizione con endonucleasi aggiuntive per arrivare ad un'identificazione di specie definitiva.

Tra le altre 17 specie per le quali la digestione con Fau I ha generato un profilo di restrizione specie-specifico, alcune presentavano pattern con un notevole grado di similitudine, caratterizzati da differenze nei frammenti di restrizione dell'ordine di poche paia di basi (pertanto di difficile discriminazione non solo con il comune gel di agarosio, ma anche con gel preparati con formulazioni speciali di agarosio e l'utilizzo di DNA ladder da 10 bp), che rendevano difficoltosa la sicura attribuzione di specie; *M. gordonae* e *M. scrofulaceum* erano caratterizzati ciascuno da due frammenti rispettivamente di 205 e 286 bp e di 202 e 289 bp, con differenze nei singoli frammenti di sole 3 bp; *M. tuberculosis* complex e *M. flavescens* presentavano tre bande rispettivamente di 134, 137 e 149 bp e di 129, 135 e 149 bp, con una differenza di 5 bp in una banda e di 2 bp in un'altra; *M. fallax* presentava tre frammenti pari a 134, 137 e 163 bp, mentre in alcuni sequevar di *M. fortuitum* e *M. tokaiense* questi erano di 134, 137, 169 bp, con una differenza pari a 6 bp in uno di essi; anche per queste specie si è reso necessario ricorrere a delle endonucleasi aggiuntive per giungere ad una sicura identificazione di specie. I ceppi e gli isolati clinici appartenenti a *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* presentavano due diversi profili di restrizione.

Per giungere all'identificazione di specie nei casi in cui la digestione con Fau I aveva prodotto profili di restrizione comuni a più specie, o molto simili tra loro, è stata selezionata una seconda endonucleasi di restrizione, BstMWI. Per quanto riguarda i gruppi che presentavano lo stesso pattern di restrizione con FauI, la digestione con BstMWI ha prodotto frammenti identici in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* e *M. bovis*, non permettendo l'identificazione di specie; nel gruppo comprendente alcuni sequevar di *Mycobacterium avium* e *M. intracellulare* la digestione prodotto diversi pattern, condivisi però da entrambe le specie, per cui non è stata possibile la differenziazione; è stato possibile identificare *M. chelonae* e *M. abscessus*, i cui profili presentavano tre bande rispettivamente di 101, 106, 223 bp e di 73, 106, 223 bp, con una differenza di 28 bp in una di esse; inoltre nel gel di agarosio la risoluzione era tale per cui le bande di 101 e 106 bp di *M. chelonae* apparivano come un'unica banda, rendendo ancora più netta la differenza tra le due specie; anche per i sequevar di *M. fortuitum* e

M. tokaiense si è giunti all'identificazione di specie, in quanto i loro profili, ciascuno dei quali caratterizzato da due bande rispettivamente di 106 e 296 bp e di 106 e 324 bp, presentavano una differenza di 28 bp in una di esse; nell'ultimo gruppo, i pattern prodotti in *M. asiaticum*, *M. malmoense* e *M. interjectum* differivano nettamente da quelli di *M. haemophilum*, in quanto i primi erano costituiti da tre frammenti e il secondo da due; inoltre *M. asiaticum*, *M. malmoense* e *M. interjectum*, i cui profili erano rispettivamente di 106, 138, 190 bp, di 97, 106, 190 bp e di 106, 122, 190 bp, presentavano una differenza in una banda compresa tra 16 bp (*M. asiaticum* e *M. interjectum*) e 41 bp (*M. asiaticum* e *M. malmoense*) a seconda delle specie considerate.

Per quanto riguarda le specie per le quali la digestione con *FauI* aveva generato profili di restrizione che differivano tra loro dell'ordine di poche paia di basi, la digestione con *BstMW I* ha prodotto pattern nettamente diversi per *M. gordonae* e *M. scrofulaceum*, avendo i frammenti di restrizione del primo dimensioni di 50, 106 e 196 bp e del secondo 101, 106, 296 bp; anche i profili di *M. tuberculosis* complex e *M. flavescens* erano tali da permettere una sicura identificazione, in quanto il primo presentava due bande di 106 e 324 bp, e il secondo tre bande di 101, 161, 163 bp, delle quali le ultime due apparivano nel gel di agarosio come un'unica banda di dimensioni nettamente minori rispetto a quella presente in *M. tuberculosis* complex; anche in *M. fallax* e alcuni sequenzi di *M. fortuitum* e *M. tokaiense*, la digestione con *BstMW I* ha prodotto profili facilmente distinguibili, perché in una delle specie erano presenti tre bande e nell'altra due.

Nessuna endonucleasi di restrizione tra quelle commercialmente disponibili ha permesso la differenziazione delle specie appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex, né di quelle appartenenti al *Mycobacterium avium* complex.

Per valutare l'accuratezza e l'affidabilità della tecnica 45 isolati clinici sono stati sottoposti ad identificazione di specie in cieco, sia mediante la metodica sviluppata, che per comodità è stata denominata *dnaK*-PRA, sia mediante altre tecniche molecolari (Brunello 2001, Roth 2000, Rogall 1990). (Tab. 4)

	<i>dnaK</i> -PRA	<i>hsp65</i> -PRA (Brunello 2001)	16S-23S-PRA (Roth 2000)
12	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> complex
13	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
3	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
1	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. intracellulare</i>
3	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
1	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
2	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
1	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>
1	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai/kansasii</i>
1	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. szulgai/kansasii</i>
1	<i>M. gordonae</i>	<i>M. xenopi/gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
1	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. farcinogenes/senegalense</i>	<i>M. fortuitum</i>
1	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum/porcinum</i>	<i>M. fortuitum/peregrinum</i>
1	<i>M. gastri</i>	<i>M. gastri/kansasii</i>	<i>M. gastri/kansasii</i>
3		<i>M. xenopi/gordonae</i>	<i>M. xenopi</i>

Tab.4 – Isolati clinici identificati in cieco

Per 19 isolati clinici, l'identificazione di specie effettuata con le tre metodiche diverse ha dato risultati concordi: 12 sono stati identificati come *M. tuberculosis* complex, 3 come *M. chelonae*, 2 come *M. gordonae*, 1 come *M. marinum*, 1 come *M. abscessus*.

L'identificazione era concorde tra la tecnica *dnaK*-PRA e una delle altre due tecniche utilizzate in 4 isolati clinici: 1 isolato è stato identificato come *M. szulgai* (*M. szulgai* | *M. kansasii* con la PRA secondo Roth 2000), 1 come *M. kansasii* (*M. szulgai* | *M. kansasii* con la PRA secondo Roth 2000), 1 come *M. fortuitum* (*M. farcinogenes* | *M. senegalense* con la PRA secondo Brunello 2001), 1 come *M. gordonae* (*M. senegalense* | *M. xenopi* con la PRA secondo Brunello 2001).

L'identificazione era univoca con la tecnica *dnaK*-PRA in due casi, in cui un isolato clinico è stato identificato come *M. gastri* e un altro come *M. fortuitum*, mentre le altre due tecniche proponevano un'alternativa di specie: rispettivamente *M. gastri* | *M. kansasii*

nel primo caso e *M. fortuitum* /*M. porcinum* e *M. fortuitum* /*M. peregrinum* nel secondo.

La *dnaK*-PRA ha identificato 17 isolati clinici come appartenenti al *Mycobacterium avium* complex, non permettendo di arrivare all'identificazione a livello di specie; 13 di questi isolati sono stati identificati da entrambe le altre tecniche come *M. avium*, 3 come *M. intracellulare*, mentre per uno di essi una delle tecniche ha dato come specie *M. intracellulare* e l'altra *M. gordonae*.

Per tre isolati clinici, la *dnaK*-PRA ha fornito un profilo di digestione non riconducibile ad alcuno di quelli conosciuti, pertanto non è stato possibile identificare i micobatteri; una delle altre due tecniche li ha identificati in maniera univoca come *M. xenopi*, mentre l'altra proponeva un'alternativa di specie: *M. xenopi* / *M. gordonae*.

Per valutare la sensibilità della *dnaK*-PRA sugli isolati clinici, la metodica è stata applicata a 40 diluizioni scalari di colture micobatteriche, caratterizzate da diverse concentrazioni dei microrganismi. La concentrazione minima che ha permesso di ottenere una buona amplificazione e una successiva digestione che producesse pattern di restrizione tali da poter identificare con chiarezza le singole specie era pari a 10 microrganismi/ μ l.

Tale valore è al di sotto del limite teorico di sensibilità dell'esame batterioscopico (Schlossberg 1999). Inoltre, per ciascuna delle diluizioni è stato allestito un vetrino per un'esame batterioscopico, e l'insieme delle osservazioni ha confermato i dati in letteratura.

La sensibilità della tecnica è stata valutata anche mediante l'utilizzo di campioni biologici dei quali si è accertata l'assenza di micobatteri e che in seguito sono stati infettati sperimentalmente con diluizioni scalari di colture micobatteriche. Come per gli isolati clinici, la concentrazione più bassa che ha permesso un'amplificazione e una successiva digestione tali da ottenere profili di restrizione interpretabili con chiarezza era pari a 10 microrganismi/ μ l.

La tecnica è stata applicata anche su 40 campioni clinici, le cui colture sono risultate positive per micobatteri. Di questi, 11 presentavano l'esame batterioscopico positivo e 29 negativo. Tra i campioni con esame batterioscopico positivo, per 9 di essi è stato possibile arrivare alla attribuzione di specie (82%). Tra i campioni con esame batterioscopico negativo, è stato possibile identificarne 20 (69%) (Tabb. 5, 6).

	Identificazione	No identificazione	Totale
Vetrino positivo per BAAR	9	2	11
Vetrino negativo per BAAR	20	9	29
Totale	29	11	40

Tab.5 – Campioni clinici sottoposti a identificazione di specie

	campione	vetrino per BAAR	identificazione da campione	identificazione da isolato
6	espettorato	Positivo	MTB complex	MTB complex
1	espettorato	Positivo	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium-intracellulare</i>
1	biopsia linfonodo	Positivo	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium-intracellulare</i>
1	biopsia cute	Positivo	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
1	biopsia cute	Positivo	nessuna amplificazione	<i>M. chelonae</i>
1	feci	Positivo	nessuna amplificazione	<i>M. avium-intracellulare</i>
5	espettorato	Negativo	MTB complex	MTB complex
1	espettorato	Negativo	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
1	espettorato	Negativo	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium-intracellulare</i>
3	espettorato	Negativo	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>
2	espettorato	Negativo	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
1	espettorato	Negativo	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
2	broncoaspirato	Negativo	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium</i>
1	broncolavaggio	Negativo	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
1	broncolavaggio	Negativo	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium-intracellulare</i>
1	biopsia linfonodo	Negativo	<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium-intracellulare</i>
1	biopsia cute	Negativo	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>
1	biopsia cute	Negativo	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
1	espettorato	Negativo	nessuna amplificazione	<i>M. abscessus</i>
1	espettorato	Negativo	nessuna amplificazione	<i>M. gordonae</i>
2	espettorato	Negativo	nessuna amplificazione	<i>M. avium-intracellulare</i>
1	espettorato	Negativo	nessuna amplificazione	<i>M. xenopi</i>
2	biopsia linfonodo	Negativo	nessuna amplificazione	<i>M. avium-intracellulare</i>
2	pus linfonodo	Negativo	nessuna amplificazione	<i>M. avium-intracellulare</i>

Tab.6 – Campioni clinici sottoposti a identificazione di specie.

Discussione

Nel corso degli anni è aumentata la consapevolezza del ruolo svolto dai micobatteri non tubercolari (NTM) quali agenti causali di malattia. Il numero di specie scoperte è in continuo aumento e di queste solo una parte è associata a malattia. Inoltre, trattandosi di organismi ubiquitari, solo occasionalmente patogeni, la diagnosi di micobatteriosi nel paziente è piuttosto complessa. Nel tempo ha assunto un ruolo sempre più rilevante il laboratorio di diagnostica micobatterologica, poiché la diagnosi di malattia e l'eventuale trattamento dipendono in maniera imprescindibile dall'isolamento e dall'identificazione di specie dei micobatteri. Inoltre è estremamente importante che i tempi per la formulazione di una diagnosi microbiologica siano per quanto è possibile contenuti, in modo che il clinico possa avere a disposizione tutti gli elementi necessari alla formulazione della diagnosi definitiva in modo che non vi siano ritardi nell'eventuale trattamento del paziente.

A tal fine, numerosi studi sono stati e sono tuttora rivolti alla messa a punto di metodiche che siano affidabili e permettano di riconoscere con semplicità e sicurezza le singole specie micobatteriche e, per quanto possibile, siano caratterizzate da facilità di esecuzione e contenimento dei costi, così da poter essere applicate nei contesti diagnostici più vari.

Il lavoro svolto si inserisce in questa linea di ricerca. Per tale ragione si è scelto di valutare la capacità discriminante di un gene mai utilizzato per questo scopo e tuttavia segnalato come un ottimo target potenziale in uno studio volto all'individuazione di nuove sequenze adatte all'identificazione di specie dei micobatteri. Al tempo stesso si è scelta quale metodica la tecnica PCR-RFLP per le sue caratteristiche di semplicità e possibilità di esecuzione anche nei laboratori dotati di limitate risorse strumentali ed economiche.

In sintesi, l'obiettivo del lavoro era la messa a punto di una nuova tecnica PCR-RFLP utilizzando un nuovo target, il locus *dnaK*, che fosse caratterizzata da grande accuratezza e affidabilità e al tempo stesso da semplicità di esecuzione tanto da poter essere applicata di routine nei laboratori diagnostici.

Il locus *dnaK* è una porzione di 451 bp del gene omonimo, il quale è stato utilizzato in uno studio per la creazione di un albero filogenetico mostrando proprietà discriminanti

e affidabilità più elevate del gene *hsp65* (Dai 2011), uno dei target maggiormente utilizzati per l'identificazione dei micobatteri in quanto dotato di un polimorfismo superiore rispetto al gene *16S RNA*. Quest'ultimo, pur essendo il gold standard non solo per l'identificazione di specie, ma anche per il riconoscimento di nuove specie micobatteriche, presenta un polimorfismo limitato, con la conseguenza che alcune specie hanno la stessa sequenza, come *M. kansasii* e *M. gastri* o un grado molto elevato di similitudine, come *M. malmoense* e *M. szulgai*. (Roth 1998).

La scelta delle specie micobatteriche da utilizzare per lo studio è stata effettuata sulla base di alcuni criteri: in primo luogo si è cercato di includere il maggior numero di specie conosciute associate a malattie nell'uomo; in secondo luogo le specie che con altre tecniche non erano tra loro differenziabili o non lo erano in modo chiaro, e ciò tenendo conto non solo dei dati disponibili in letteratura (Roth, 1998), ma anche dell'esperienza nel campo della diagnostica dei NTM del personale del Laboratorio di Micobatteriologia dell'Università degli Studi di Sassari, presso il quale è stato svolto il lavoro; in terzo luogo si è tenuto conto della disponibilità di ceppi di riferimento e di isolati clinici appartenenti alla collezione del medesimo laboratorio: tutti gli isolati clinici disponibili sono stati sottoposti ad una nuova identificazione di specie mediante una serie di tecniche molecolari: una PCR-RFLP avente come target un frammento di 441 bp del gene *hsp 65* (Brunello 2001), una PCR-RFLP avente come target il gene spaziatore 16S-23S (rRNA) (Roth 2000) e il sequenziamento del gene per la subunità ribosomiale 16S (rDNA) (Rogall 1990) e per lo studio sono stati utilizzati quelli per i quali l'attribuzione di specie è risultata assolutamente priva di incertezza. L'insieme di questi criteri ha determinato la selezione di 33 ceppi di riferimento e 58 isolati clinici, appartenenti a 30 specie micobatteriche (Tabb.1, 2)

L'amplificazione mediante PCR del locus *dnaK* nei ceppi di riferimento e negli isolati clinici del genere *Mycobacterium* ha presentato una sensibilità del 100%. Questo è probabilmente dovuto a diversi fattori. In primo luogo, le dimensioni del locus, pari a 451 bp, erano tali da permettere un'elevata efficienza nell'amplificazione del target mediante PCR, rispetto a target molto lunghi, per i quali la resa è notevolmente più bassa; in secondo luogo i primer utilizzati, gli stessi del lavoro utilizzato come punto di partenza per questo studio (Dai 2011), erano disegnati su porzioni delle regioni omologhe comuni (CHR) altamente conservate nelle diverse specie; infine, è stato messo

a punto un nuovo protocollo di amplificazione rispetto a quello utilizzato nel suddetto lavoro (Dai 2011), che ha determinato un significativo aumento della resa.

I test per valutare la sensibilità della tecnica hanno dimostrato che era sufficiente una concentrazione di micobatteri pari a 10^0 microrganismi/ μ l perché si avesse amplificazione, sebbene la resa non fosse sufficientemente elevata da permettere una successiva analisi di restrizione ottimale. La concentrazione minima che ha permesso di ottenere pattern di restrizione chiaramente interpretabili era pari a 10 microrganismi/ μ l. L'aumento del numero di cicli nel programma di amplificazione non ha determinato un aumento apprezzabile della resa.

Non solo il protocollo di amplificazione si è dimostrato molto sensibile e dotato di una buona resa, ma non si è verificata l'amplificazione di sequenze aspecifiche, né la formazione di dimeri di primer che potessero interferire con la successiva digestione enzimatica.

La specificità dei primer e del protocollo è risultata anch'essa pari al 100%, dal momento che non si è avuta amplificazione del target in nessuno dei ceppi appartenenti a generi diversi da *Mycobacterium*.

Gli enzimi di restrizione *FauI* e *BstMWI*, utilizzati per la creazione dell'algoritmo sono stati scelti con estrema attenzione fra tutti quelli commercialmente disponibili, perché permettevano non solo di ottenere pattern di restrizione specie-specifici per la quasi totalità delle specie analizzate, ma i singoli pattern erano costituiti da frammenti di restrizione abbastanza lunghi (almeno 50 bp) e con differenze tra di essi sufficientemente grandi (almeno 16 bp) da consentirne una corretta interpretazione anche quando il loro rilevamento veniva effettuato attraverso la semplice visualizzazione dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio, senza l'ausilio dell'analisi assistita del computer. In alcuni casi la differenza nei frammenti generata dall'enzima di restrizione di prima linea *FauI* era molto piccola (3 bp), ma l'insieme dei pattern generati per ciascuna specie dai due enzimi era tale da permettere la sicura distinzione di ciascuna specie dalle altre. Le dimensioni delle bande visualizzabili nel gel di agarosio non hanno presentato scostamenti apprezzabili rispetto alle dimensioni teoriche previste con il software utilizzato per la scelta delle endonucleasi di restrizione.

La maggior parte delle specie può essere identificata attraverso l'uso di un solo enzima di restrizione, e tutte possono esserlo attraverso l'uso del secondo enzima.

L'esecuzione di routine di entrambe le digestioni da un lato può consentire un'identificazione di specie più rapida in caso di isolati appartenenti a specie in cui entrambe siano indispensabili, dall'altro permette di avere una conferma di specie in caso di identificazione certa con il solo *Faul*.

La sequenza genica utilizzata come target e la scelta accurata degli enzimi di restrizione hanno permesso di ottenere un algoritmo per l'identificazione di specie dei micobatteri caratterizzato da una elevata capacità discriminante, con profili di restrizione specie-specifici per 25 delle 30 specie analizzate e complesso-specifici per le restanti 5, 3 delle quali appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*) e 2 costituenti il *Mycobacterium avium* complex (*M. avium* e *M. intracellulare*).

Come detto in precedenza, tali profili sono risultati specie-specifici e sufficientemente diversi per poter esser interpretati e riconosciuti attraverso la semplice osservazione del gel di agarosio, e conseguentemente ciascuna specie è risultata facilmente distinguibile dalle altre, con l'eccezione delle specie del *Mycobacterium tuberculosis* complex e del *Mycobacterium avium* complex. E' opportuno segnalare che nessuno degli enzimi di restrizione commercialmente disponibili è stato in grado di generare profili specie-specifici per i due complex, il che indica la mancanza di variabilità del locus *dnaK* nel *Mycobacterium tuberculosis* complex, poiché i profili erano identici per tutti i ceppi e gli isolati clinici, mentre nel *Mycobacterium avium* complex la variabilità è presente, ma non è specie-specifica, dal momento che *M. avium* e *M. intracellulare* condividevano i medesimi pattern di restrizione; pertanto il locus *dnaK* non è utilizzabile per la differenziazione di queste specie. E' innegabile che la possibilità di differenziare *M. avium* e *M. intracellulare* avrebbe dato un valore maggiore alla *dnaK*-PRA, tuttavia alcuni autori ritengono che tale differenziazione abbia un valore clinico incerto per il singolo paziente e pertanto non sia indispensabile, con la conseguenza che in genere non viene effettuata e l'identificazione si ferma a livello di complex (Griffith 2014). E' stato invece possibile differenziare con chiarezza le coppie *M. gastri*/*M. kansasii* e *M. malmoense*/*M. szulgai* la cui differenziazione non è possibile o presenta difficoltà con altre tecniche (Rogall 1990, Roth 1998, Brunello 2001) (Tab. 3)

I test in cieco della metodica sugli isolati clinici hanno confermato l'accuratezza e l'affidabilità della tecnica. L'identificazione di specie è risultata concorde con le tecniche utilizzate come controllo (Brunello 2001, Roth 2000) nel 78% degli isolati, sebbene le

altre tecniche siano state in grado di discriminare tra *M. avium* e *M. intracellulare*, mentre l'identificazione da parte della *dnaK*-PRA si sia fermata a livello di *M. avium* complex (Tab. 4). Considerando i soli isolati NTM, la percentuale di accordo era pari al 70%. Nei restanti casi si sono verificate diverse eventualità: nel 12% i risultati della *dnaK*-PRA erano in accordo con una delle due tecniche di controllo, ma non con l'altra; tale percentuale sale al 15% se si include l'identificazione a livello di complex (*M. avium-intracellulare*) con la *dnaK*-PRA per un isolato che una delle altre tecniche ha identificato a livello di specie (*M. intracellulare*); nel 6% l'identificazione di specie è stata univoca con la *dnaK*-PRA, mentre le altre due tecniche proponevano l'alternativa tra due specie diverse; l'insieme di queste discordanze può essere spiegato considerando che ciascuna delle tecniche utilizza un target diverso, caratterizzato da una diversa variabilità interspecifica e pertanto è possibile che il riconoscimento di specie risulti più semplice per alcune specie piuttosto che per altre: infatti risultati discordanti sono stati ottenuti non solo tra la tecnica *dnaK*-PRA e le altre, ma anche tra queste due, in percentuale pari al 21% degli isolati NTM analizzati; vale la pena sottolineare che nell'insieme ciascuna delle identificazioni di specie proposte dalla *dnaK*-PRA non è apparsa sorprendente, in quanto per lo più era in linea con l'insieme delle opzioni proposte dalle altre tecniche, ma era piuttosto il risultato di una maggiore capacità discriminante volutamente ricercata attraverso la scelta accurata degli enzimi di restrizione. Infine, nel 9% dei casi la *dnaK*-PRA non ha permesso l'identificazione di specie, in quanto la digestione enzimatica ha generato un profilo di restrizione non presente nell'algoritmo, mentre le altre tecniche hanno proposto rispettivamente un'unica specie e un'alternativa tra due specie; questo risultato molto probabilmente è dovuto al fatto che il micobatterio in esame o apparteneva ad una specie diversa da quelle incluse nell'algoritmo o ad una specie inclusa, ma a un sequenziamento diverso da quelli analizzati; si è escluso che tale pattern fosse dovuto a due o più specie, come risultato di una coinfezione nel paziente o di una contaminazione crociata, in quanto pur essendo questa un'eventualità da prendere in considerazione quando ci si trova in presenza di un profilo di restrizione sconosciuto, il pattern in questione non presentava caratteristiche compatibili con questa opzione (pattern sovrapposti).

L'ottenimento di profili specie-specifici piuttosto diversi tra loro può essere considerato una conferma dell'elevata variabilità interspecifica del locus *dnaK*, segnalata nel lavoro di Dai, sebbene il numero di specie disponibili per lo studio fosse limitato rispetto a quello

di specie ufficialmente riconosciute; sarebbe interessante eseguire studi comprendenti le specie micobatteriche che non è stato possibile utilizzare in questo studio, i quali potrebbero confermare il risultato, consentendo di ottenere profili specie-specifici anche per altre specie e permettendo una più ampia applicazione della metodica.

Per quanto riguarda la variabilità intraspecifica del target, per 16 specie è stato possibile analizzare solo il ceppo di riferimento, per cui il profilo di restrizione non può essere considerato come discriminante, dal momento che non si può escludere un'eterogeneità genetica che determina più di un pattern per la specie; tuttavia per le restanti 14 delle specie analizzate era disponibile più di un ceppo o isolato clinico, e solo per 4 di esse l'analisi di restrizione ha generato due profili differenti (*M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*); nelle restanti 10 il profilo era unico e pertanto può essere considerato discriminante. E' interessante notare che tra le specie in cui per il ceppo e gli isolati clinici è stato generato un unico profilo di restrizione vi è *M. gordonae*, dal momento che alcuni autori ne descrivono una certa variabilità intraspecifica entro alcuni geni (Plikaytis 1992, Kirschner 1993), che determina la generazione di più profili di restrizione con altre tecniche (Roth 2000, Brunello 2001): il risultato ottenuto, insieme con la generazione di due soli pattern di restrizione per un numero limitato di specie analizzate, potrebbe essere un'indicazione di una limitata eterogeneità intragenica, sebbene solo attraverso ulteriori studi che comprendano più isolati per ciascuna specie è possibile avere una conferma di questa ipotesi.

Sulla base dei risultati ottenuti nei test sugli isolati clinici, che hanno confermato l'affidabilità della *dnaK*-PRA, e di quelli ottenuti nelle prove di sensibilità, che hanno stabilito che la concentrazione minima che permette la generazione di un pattern di restrizione che consente l'attribuzione di specie è al di sotto del limite di sensibilità del microscopio ottico, è stata valutata la capacità della metodica di identificare le specie micobatteriche direttamente nei campioni clinici. In generale, i risultati ottenuti su campioni di natura diversa, le cui colture sono risultate positive per micobatteri, mostrano che mediante la *dnaK*-PRA è possibile identificare a livello di specie i micobatteri presenti nei campioni clinici. Le percentuali di successo nei campioni analizzati variavano dal 69% per quelli in cui l'esame batterioscopico era negativo per BAAR, all'82% per quelli in cui l'esame era positivo (Tabb 5, 6).

Il numero di campioni positivi per NTM disponibili per l'analisi purtroppo era ridotto, pertanto si sono dovuti includere anche alcuni positivi per *M. tuberculosis* complex per

poter valutare l'applicabilità della tecnica. Anche così, il numero di campioni, soprattutto se rapportato alle numerose variabili, quali tipologia di campione, risultato dell'esame batterioscopico, momento nel quale è stato eseguito l'esame (risultato dell'esame batterioscopico o positivizzazione della coltura), è piuttosto limitato perché si possano trarre delle conclusioni univoche. Tuttavia, è comunque possibile fare alcune considerazioni.

Nell'applicazione della tecnica ai campioni clinici, il fattore limitante è stato rappresentato dall'amplificazione. Una volta avvenuta l'amplificazione, la successiva digestione enzimatica è avvenuta senza difficoltà. Sebbene alcuni autori suggeriscano la presenza di inibitori degli enzimi di restrizione nei campioni clinici (Telenti 1993), non si sono verificati casi in cui ad una buona amplificazione del target abbia fatto seguito una digestione enzimatica in cui la qualità del pattern di restrizione ha impedito l'identificazione di specie. L'utilizzo degli stessi protocolli per l'estrazione del DNA e per la PCR utilizzati per i ceppi e gli isolati clinici non sempre ha avuto come risultato l'amplificazione del locus *dnaK*-PRA, anche in campioni clinici in cui l'esame batterioscopico era positivo; in particolare non si è mai verificata amplificazione nei linfonodi e nelle biopsie. L'aumento del numero di cicli nel protocollo PCR non ha determinato un aumento apprezzabile della resa della reazione, mentre il ricorso a metodiche alternative per l'estrazione del DNA è stato determinante in diversi casi.

Le tecniche che causano la rottura meccanica della parete micobatterica, come la sonicazione o l'utilizzo delle biglie di vetro (Buck 1992, Telenti 1993), non hanno prodotto risultati dissimili rispetto alla semplice bollitura.

Per alcune tipologie di campioni, in particolare le biopsie e i linfonodi, si è rivelato molto utile far precedere all'estrazione mediante bollitura o rottura meccanica della parete una digestione enzimatica con proteinasi K, che ha permesso l'amplificazione del target in diversi casi e conseguentemente la possibilità di effettuare la digestione con le endonucleasi di restrizione.

Tuttavia i risultati non sono stati univoci e sarebbero opportuni ulteriori studi per arrivare all'elaborazione di un'unico protocollo di estrazione. Per il momento non è stato possibile procedere in questa direzione a causa del numero ridotto di campioni e della limitata quantità di materiale disponibile. In ogni caso, vale la pena ricordare che dal momento che nei campioni biologici talvolta possono essere presenti degli inibitori dell'amplificazione mediante PCR (ad esempio l'emoglobina), in alcuni casi potrebbe

essere utile il ricorso a tecniche di estrazione del DNA che ne prevedono la purificazione, sebbene ciò determini un inevitabile allungamento dei tempi. Come detto in precedenza, non sono stati osservati effetti di inibizione sugli enzimi di restrizione, come ipotizzato da alcuni autori (Telenti 1993): la digestione con ciascuno dei due enzimi ha permesso di ottenere un pattern di restrizione per tutti gli ampliconi, che ha permesso l'attribuzione di specie. Inoltre, in tutti i casi in cui è stato possibile identificare le specie micobatteriche i risultati erano in accordo con quelli ottenuti sugli isolati dalle colture positivizzate in seguito (Tab. 6).

In generale, questi risultati possono ritenersi molto buoni, dal momento che attualmente sono state descritte poche tecniche per l'identificazione dei micobatteri dai campioni clinici, le quali richiedono costi elevati per la loro esecuzione, sia in termini di materiali che di strumentazione (Griffith 2007), pertanto la possibilità di usufruire di una tecnica affidabile, di semplice e rapida esecuzione, quale la *dnaK*-PRA potrebbe permettere anche ai laboratori diagnostici meno all'avanguardia di fornire ai clinici un maggior numero di elementi per la formulazione di una diagnosi già al momento del ricevimento dei campioni. Una possibilità di questo tipo sarebbe molto importante soprattutto nei paesi in cui l'incidenza della tubercolosi è molto elevata e le risorse economiche sono molto limitate, nei quali la diagnosi si basa essenzialmente sull'esame batterioscopico dei campioni e l'accesso ai metodi colturali è virtualmente inesistente. In questi contesti di fronte ad un esame batterioscopico positivo per bacilli acido-alcool resistenti, i medici tendono a non prendere in considerazione la possibilità che la causa di malattia possa essere un NTM (Shojaei 2011) e anche quando possano effettuare questa ipotesi, non possiedono i mezzi diagnostici per differenziare tra *M. tuberculosis* e NTM (Mandira 2013). La buona sensibilità della tecnica *dnaK*-PRA anche quando applicata ai campioni con esame batterioscopico positivo potrebbe essere di grande aiuto nella diagnosi corretta, soprattutto considerando che in queste realtà difficilmente si effettuano i test di suscettibilità ai farmaci, e pertanto un'errata diagnosi comporta inevitabilmente il ricorso ad un trattamento quanto meno inefficace, se non addirittura dannoso.

In conclusione, l'insieme dei risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che questa nuova metodica PCR-RFLP avente come target il locus *dnaK* è un metodo semplice, rapido e accurato per l'identificazione degli isolati clinici micobatterici a livello di specie e può essere di grande aiuto per il rilevamento e l'attribuzione di specie dei micobatteri anche nei campioni clinici.

In considerazione di queste caratteristiche, sarebbe molto utile intraprendere ulteriori ricerche che comprendano ceppi e isolati clinici appartenenti a specie non considerate, per studiarne i profili di restrizione e valutare la possibilità di estendere l'applicazione della *dnaK*-PRA anche all'identificazione di un numero più vasto di specie; inoltre sarebbe interessante estendere gli studi sull'applicabilità della metodica ai campioni clinici ad un insieme più ampio per numero e tipologia, al fine di individuare condizioni che ne permettano l'applicazione standardizzata.

Bibliografia

Adékambi T, Colson P, Drancourt M - *rpo*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. - 2003 J. Clin. Microbiol. 41: 5699-5708

Ballarino GJ, Olivier KN, Claypool RJ *et al.* - Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: antibiotic treatment and associated costs. - 2009 Respir Med 103: 1448-55

Beran V, Matlova L, Dvorska L *et al.* - Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. - 2006 J Fish Dis Jul; 29 (7): 383-93

Brown-Elliott BA, Griffith DE, Wallace RJ Jr – Newly described or emergent human species of nontuberculous mycobacteria. – 2002 Infect Dis Clin North Am 16:187

Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr – Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. - 2002. Clin Microbiol Rev 15: 716-46

Brown BA, Springer B, Steingrube VA *et al.* - *Mycobacterium wolinskyi* sp and *Mycobacterium goodii* sp. nov. rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. - 1999 Int J Syst Bacteriol 49: 1493-1511

Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E *et al.*- Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. - 2001 J Clin Microbiol Aug; 2799-2806

Buck G, O'Hara L, Summersgill J – Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. - 1992 J Clin Microbiol 30: 1331-34

Buijtelts PC, Petit PL – Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. - 2005 J Microbiol Methods 62: 83-8

Butler WR, Jost KC, Kilburn JO – Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. - 1991 J Clin Microbiol 29: 2468-72

Butler WR, Guthertz LS - Mycolic acid analysis by high performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. - 2001 Clin Microbiol Rev 14: 704-726

Cassidy PM, Hedberg K *et al.* – Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology – 2009 Clinical Infectious Diseases 49: 124-9

Chai N, Deforges L, Sougakoff W *et al.* - *Mycobacterium szulgai* infection in a captive population of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*) – 2006 J Zoo Wild Med 37: 55-58

Chow SP, Ip FK, Iau JHK *et al.* - *Mycobacterium marinum* infection of the hand and wrist. Results of conservative treatment in twentyfour cases – 1987 J Bone Joint Surg 69-A: 1161-8

Colins F, Watson S - Immune response to atypical mycobacterial lung infections - 1981 Rev Infect Dis 3: 981-9

Collins FM - Mycobacterial disease, immunosuppression and acquired immunodeficiency syndrome. 1989. Clin Microbiol. Rev. 2: 360-77

Comincini S, Barbarini D, Telecco S *et al.* - Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis within sigma factor regions. - 1998 New Microbiol 21: 391-5

Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL *et al.* - Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. - 1999 Appl Environ Microbiol 65, 2492-96

Dai J, Chen Y, Dean S *et al.* - Multiple-genome comparison reveals new loci for *Mycobacterium* species identification. - 2011 J Clin Microbiol, 49 (1): 144-53

De Groote MA, Pace NR, Fulton K *et al.* - Relationship between *Mycobacterium* isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soil. - 2006 Appl Environ Microbiol 72, 7602-06

Dhama K, Mahendran M, Tiwari R *et al.* - Tuberculosis in birds: insights into the *Mycobacterium avium* infections. - 2011 Vet Med Int 1-14

Domenech P, Menendez MC, Garcia MJ - Restriction fragment length polymorphism of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species - 1994 FEMS Microbiol Lett 116, 19-24

Edwards U, Rogall T, Blocker H *et al.* - Isolation and direct sequencing of entire genes. Characterization of a gene encoding for 16S ribosomal RNA. - 1989 Nucleic Acid Res 17: 7843-53

Falkinham JO III - Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. - 1996 Clin Microbiol Rev; 9: 177-215

Falkinham JO III, Norton CD, LeChevallier MW - Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and other mycobacteria in drinking water distribution systems. - 2001 Appl Environ Microbiol 67: 1225-31

Falkinham JO III, Iseman MD, de Haas P - 2008 *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. - J Water Health 6, 209-13

Falkinham JO III – Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. - 2009 J Appl Microbiol 107 (2): 356-67

Ferreira R, Fonseca L, Alfonso A *et al.* - A report of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in bullfrogs (*Rana catesbeiana*) – 2004 Vet J 171: 177-180

Ferroni A, Vu-Thien H, Lanotte P *et al.* - Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. - 2006 J Clin Microbiol Jun 44 (6): 2237-9

Field SK, Fisher D, Cowie RL - *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. - 2004 Chest 126: 566-581

Frucht D, Holland S - Defective monocyte costimulation for interferon gamma production in familial disseminated *Mycobacterium avium* complex infection. - 1996 J Immunol;157: 411-16

Gingeras TR, Ghandour G, Wang E – Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. - 1998 Genome Res 8: 435-448

Glawischnig W, Steineck T, Spargser J – Infections caused by *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *hominissuis* and *paratuberculosis* in free-ranging red deer (*cervus elaphus hippelaphus*) in Austria, 2001-2004. - 2006 Journal of Wildlife Diseases; 42(4): 724-31

Good RC – From the Center for Disease Control. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States. - 1980 J Infect Dis; 142: 779-783

Green SL, Lifland BD, Bowley DM *et al.*- Disease attributed to *Mycobacterium chelonae* in South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). - 2000 Comp Med Dec 50(6): 675-9

Griffith DE – Nontuberculous mycobacteria. - 2004 In: Cohen J, Powderly WG eds. 2nd ed. Edinburgh, Scotland: CV Mosby: 419-30

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA *et al.*, on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases.- 2007 Am J Respir Crit Care Med Vol. 175 pp 367-416

Griffith DE – Microbiology of nontuberculous mycobacteria – 2014 www.uptodate.com

Hazra R, Robson CD, Perez-Atayde AR *et al.* - Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy. - 1999 Clin Infect Dis 28: 123-29

Hernandez-Divers SJ, Shearer D - Pulmonary mycobacteriosis caused by *Mycobacterium haemophilum* and *M. marinum* in a royal pyton – 2002 J Am Vet Med Assoc Jun 1; 220 (11):1661-3

Horsburgh CH Jr, Selik RM - The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). - 1989 Am Rev Respir Dis Jan 139 (1): 4-7

Horsburgh CH Jr, Caldwell MB, Simonds RJ - Epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial disease in children with acquired immunodeficiency syndrome. - 1993 Pediatric Infect Dis J Mar, 12 (3): 219-22

Horsburgh CH Jr - Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. - 1996 Semin Respir Infect; 11: 244-51

Horsburgh CH Jr - Epidemiology of *Mycobacterium avium* complex. - In Korvick JA, Benson CA eds.: *Mycobacterium avium* complex infection: progress in research and treatment. - 1996 New York, NY: Marcel Dekker; 1-22

Hughes MS, Skuce RA, Beck LA – Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. - 1993 J Clin Microbiol; 31:3216-22

Huminer D, Pitlik SD, Block C *et al.* - Aquarium-borne *Mycobacterium marinum* skin infection. Report of a case and review of the literature. - 1986 Arch Dermatol Jun 122 (6): 698-703

Ioachimescu OC, Walton Thomford J - Nontuberculous mycobacterial disorders - Cleveland Clinic - www.clevelandclinicmedem.com

Jacobs JM, Stine CB, Baya AM *et al.* - A review of mycobacteriosis in marine fish - 2009 Feb 32 (2): 119-130

Jarzembowski JA, Young MB - Nontuberculous Mycobacterial Infections - 2008 Arch pathol Lab Med Aug 132 (8): 1333-41

Johnson PD, Azuolas J, Lavender CJ *et al.* - *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia - Emerg Infect Dis 2007 Nov 13(11): 1653-60

Kaevska M, Lvonicik S, Slana I *et al.* - Microscopy, culture and quantitative real-time PCR examination confirm internalization of mycobacteria in plants. - 2014 Appl Environ Microbiol Jul 80 (13): 3888-94

Karakousis PC, Moore RD, Chaisson RE - *Mycobacterium avium* complex in the era of highly active antiretroviral therapy. - 2004 Lancet Infect Dis; 4: 557-565

Kasai H, Ezaki T, Harayama S - Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. - 2000 J Clin Microbiol; 38: 301-8

Katoch VM - Infection due to non-tuberculous mycobacteria (NTM) - 2004 Indian J Med Res October 120: 290-304

Katoch VM, Mohan Kumar T - Atypical mycobacterial infections. In: Sharma SK, editor. Tuberculosis, 1st ed - 2001 New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd; 439-51

Katoch VM, Parashar D, Cauhan DS *et al.* - Rapid identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique targeting 16S-23S ribosomal RNA internal transcribed spacer and flanking region – 2007 Indian J Med Res 125: 155-62

Kelly P, Karlson A, Weed L *et al.* - Infection of synovial tissues by mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*. - 1967 J Bone Joint Surg (Am); 49:1521-30

Kern W, Vanek E, Jungbluth H – Fish breeder granuloma: infection caused by *Mycobacterium marinum* and other atypical mycobacteria in the human. Analysis of 8 cases and review of the literature – 1989 Med Klin (Munich) Dec 15; 84 (12): 578-8

Kim BJ, Lee SH, Lyu MA *et al.* - Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). - 1999 J Clin Microbiol 37: 1714-20.

Kim BJ, Lee KH, Park BN *et al.* - Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of RNA polymerase gene (*rpoB*). - 2001 J Clin Microbiol 39: 2102-9

Kim H, Kim SH, Shim TS *et al.* - PCR restriction fragment length polymorphism (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for the identification of *Mycobacterium* spp. - 2005 J Microbiol Met 62:199-209

Kirsch P, Nusser P, Hotzel H *et al.* - *Mycobacterium gordonae* as a potential cause of granulomatous lesions of the toe tips in the South African clawed frogs (*Xenopus laevis*) – 2008 Berl Munch Tierarztl Wochenschr Jul-Aug 121 (7-8): 270-7

Kirschner P, Böttger E – Microheterogeneity within rRNA of *Mycobacterium gordonae*.- 1992 J Clin Microbiol 30: 1049-1050

Kirschner P, Springer B, Vogel U *et al.* - Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. - 1993 J Clin Microbiol 31:2882-9

Kwok S, Higushi R. - Avoiding false positives with PCR. - 1989 Nature May 18; 339 (6221): 237-8

Lappayawichit P, Rienthong S, Rienthong D *et al.* - Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences – 1996 Tubercle Lung Dis 77 (3): 257-63

Lavender CJ, Fyfe JA, Azuolas J *et al.* - Risk of Buruli ulcer and detection of *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes in southeastern Australia. - 2011 PloS Negl Trop Dis Sep 5 (9): e1305

Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD *et al.* - Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. - 1992 J Clin Microbiol 30: 2476-78

Leigheb G, Zavattaro E, Molicotti P *et al.* – Clinical consideration on Buruli ulcer employing two molecular tests for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in 100 skin biopsies. – 2014 Int J Dermatol 53 (2): 213-20

Lettieri CJ – Nontuberculous mycobacteria: update on diagnosis and treatment – 2008 Medscape Pulmonary Medicine

Levin M, Newport M, D'Sousa S *et al.* - Familial disseminated atypical mycobacterial infection in childhood: A human mycobacterial susceptibility gene? - 1995 Lancet 345: 79-83

Lévy-Frébault V, Pangon B, Buré A *et al.* - *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium avium-intracellulare* mixed infection in acquired immunodeficiency syndrome. - 1987 J Clin Microbiol 25:154-57

Margaret M, Johnson JAO. - Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. - 2014 Journal of Thoracic Disease 6: 210-20

Marras TK, Daley CL – Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria – 2002 Clin Chest Med 23, 553-567

Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J *et al.* - Nontuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. - 2004 Int J Tuberc Lung Dis 8: 1186-93

Massenkeil G, Opravil M, Salfinger M *et al.* - Disseminated coinfection with *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium kansasii* in a patient with AIDS and liver abscess - 1992 Clin Infect Dis 14: 618-9

Matlova L, Dvorska L, Palecek K *et al.* - Impact of sawdust and wood shaving in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 from pigs and environment. - 2004 Vet Microbiol 102 (3-4): 227-236

McIntosh M, Williamson H, Benbow ME *et al.* - Associations between *Mycobacterium ulcerans* and aquatic plant communities of West Africa: implication for Buruli Ulcer Disease – 2014 EcoHealth Jun Vol 11 Iss 2: 184-196

McNabb A, Eisler D, Adie K *et al.* - Assessment of partial sequencing of the 65-kiloDalton heat shock protein gene (hsp 65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources - 2004 J Clin Microbiol 42: 3000-11

Mignard S, Flandrois JP – Identification of *Mycobacterium* using the EF-Tu encoding (*tuf*) gene and the tmRNA encoding (*ssrA*) gene. - 2007 J Med Microbiol 56: 1033-41

Mignard S, Flandrois JP – A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. - 2008 Int J Syst Evol Microbiol 58: 1432-41

Mirsaeidi M, Machado RF, Garcia JGN *et al.* - Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: a population-based comparative study - 2014 *PLoS ONE* vol. 9, no 3, Article ID e91879

Molicotti P, Bua A, Cannas *et al.* - Identification of non tuberculous mycobacteria from clinical samples. - 2013 *New Microbiol* 36(4): 409-11

Moran JF, Alexander LJ, Staub EW *et al.* - Long-term results of pulmonary resection of atypical mycobacterial disease - 1983 *Ann Thor Surg* 35: 597-604

Musial C, Tice L, Stockman L *et al.* - Identification of Mycobacteria from culture using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1988 26: 2010-12

NCCLS - Susceptibility testing for mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes; approved standard M24 2003 A. Wayne, PA: NCCLS.

Nelson KG, Griffith DE, Brown BA *et al.* - Results of operation in *Mycobacterium avium-intracellulare* lung disease. - 1998 *Ann Thorac Surg* 66: 325-30

Newman GW, Gan HX, McCarthy PL *et al.* - Survival of human macrophages infected with *Mycobacterium avium-intracellulare* correlates with increased production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6. - 1991 *J Immunol* 147: 3942-48

Newport M, Huxley C, Houston S *et al.* - A mutation in the interferon gamma receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. - 1996 *N Engl J Med* 335:1941-49

Norton CD, LeChevallier MW, Falkinham JO III - Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. - 2004 *Water Res* 38: 1457-66

O'Brien RJ, Geiter LJ, Snider DE Jr – The epidemiology of nontuberculous mycobacteria diseases in the United States: results from a national survey. - 1987 Am Rev Respir Dis 135: 1007-14

Pai HH, Chen WC, Peng CF – Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital cockroaches (*Periplaneta americana*) – 2003 J Hosp Infect Mar 53(3): 224-8

Pechère M, Opravil M, Wald A *et al.* - Clinical and epidemiological features of infections with *Mycobacterium genavense*. - 1995 Arch Intern Med 155: 400-4

Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakus MA *et al.* - Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. - 1992 J Clin Microbiol Jul: 1815-22

Pomerantz M, Madsen L, Goble M *et al.* - Surgical management of resistant *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial pulmonary infections. - 1991 Ann Thor Surg 52: 1108-12

Portaels P, Kunze ZM, McFadden JJ *et al.* AIDS and mycobacterial diseases in developing and developed countries. - 1991 J Chemother (Suppl 4): 449-50

Prabhakar S, Mishra A, Singhal A *et al.* - Use of the *hupB* gene encoding a histone like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. - 2004 J Clin Microbiol 42: 2724-32

Reed C, von Reyn CF, Chamblee S *et al.* - Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. - 2006 Am J Epidemiol 164, 32-40

Ricaldi JN, Guerra H. - A simple and improved method for diagnosis of tuberculosis using hypertonic saline and sodium hydroxide to concentrate and decontaminate sputum. - 2008 Trop Doct 38: 97-99

Richter E, Weizenegger M, Rüsç-Gardes S *et al.* Evaluation of GenoType MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. - 2003 J Clin Microbiol 41:2672-75

Rodrigo G, Kallenius G, Hoffman E *et al.* Diagnosis of mycobacterial infection by PCR and restriction enzyme digestion. - 1992 Lett Appl Microbiol 15: 41-4

Roecklein JA, Swartz RP, Yeager H Jr: Nonopsonic uptake of *Mycobacterium avium* complex by human monocytes and alveolar macrophages. - 1992 J Lab Clin Med 119:772-81

Rogall T, Flohr T, Bottger EC - Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. - 1990 J Gen Microbiol; 136: 1915-20

Roth A, Fisher M, Hamid ME *et al.* Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. - 1998 J Clin Microbiol 36:139-47

Roth A, Reischl U, Streubel A *et al.* Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus specific amplification of 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. - 2000 J Clin Microbiol 38: 1094-104

Russo C, Tortoli E, Menichella D - Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. - 2006 J Clin Microbiol 44: 334-39

Samra Z, Kaufmann L, Zeharia A *et al.* - Optimal detection and identification of *Mycobacterium haemophilum* in specimens from pediatric patients with cervical lymphadenopathy. - 1999 J Clin Microbiol 37: 832-4

Sanchez-Morgado JM, Gallagher A, Johnson LK - *Mycobacterium gordonae* infection in a colony of African clawed frog (*Xenopus tropicalis*). - 2009 Lab Anim Jul 43 (3): 300-3

Schwabacher H – A strain of mycobacterium isolated from skin lesions of a cold-blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relationship to atypical acid-fast bacilli occurring in man. - 1959 J Hyg (Lond); 57: 57-67

Sechi LA, Colorni A, Duprè I *et al.* - Strain variation in Mediterranean and Red Sea *Mycobacterium marinum* isolates. – 2002 New Microbiologica 25(3): 351-6

Shima Hadifar, Sharareh Moghim, Hossein Fazeli *et al.* - Molecular typing of Iranian mycobacteria isolates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of 360-bp *rpoB* gene. - 2015 Adv Biomed Res 4: 152

Shiraishi Y, Nakajima Y, Takasuna K *et al.* - Surgery for *Mycobacterium avium* complex lung disease in the clarithromycin era. - 2002 Eur Cardiothorac Surg 21: 314-18

Schlossberg D - Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. - 1999 Fourth Edition W.B. SAUNDERS COMPANY

Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A *et al.* - Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country. - 2011 Jpn J Infect Dis 64, 265-271

Skogberg K, Ruutu P, Tukiainen P *et al.* – Nontuberculous mycobacterial infection in HIV-negative patients receiving immunosuppressive therapy. - 1995 Eur J Clin Microbiol Infect Dis 14: 755-63

Soini H, Bottger EC, Viljanen MK – identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. - 1994 J Clin Microbiol 32: 2944-47

Somoskovi A, Magyar P – Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with MB Redox, Lowenstein-Jensen and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. - 1999 J Clin Microbiol 37: 1366-69

Somoskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M *et al.* – Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. - 2001 Chest 120: 250-7

Springer B, Tortoli E, Richter I *et al.* - *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. - 1995 J Clin Microbiol 33: 2805-11

Springer B, Stockman L, Teschner G *et al.* Two collaborative studies on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. - 1996 J Clin Microbiol 34:296-303

Sreevatsan S, Escalante P, Pan I X *et al.* - Identification of polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *M. bovis* - 1996 J Clin. Microbiol 34: 2007-10

Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society Management of opportunistic mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. - 2000 Thorax 55: 210-8

Takewaki S, Okuzumi K, Ishiko K *et al.* - Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. - 1993 J Clin Microbiol 31: 446-450

Takewaki S, Okuzumi K, Manabe I *et al.* - Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. - 1994 Int J Syst Bacteriol 44:159-66

Telenti A, Marchesi F, Balz M *et al.* - Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. - 1993 J Clin Microbiol 31: 175-78

Thorel MF, Huchzermeyer HF, Michel AL – *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) – 2001; 20(1): 204-218

Tortoli E - Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. - 2003 Clin Microbiol Rev 16: 319-54

Tortoli E - Clinical features of infections caused by new nontuberculous mycobacteria. Part. I. - 2004 Clin Microbiol Newsl 26: 89-95

Tortoli E - Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections - 2009 Clin Microbiol Infect 15: 906-910

Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G - Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probes assay for mycobacterial identification. - 2003 J Clin Microbiol 41: 18-4420

Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S - A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. - 2000 Mem Ins Oswaldo Cruz; 95: 855-8

Varma-Basil M, Garima K, Pathak R *et al.* - Development of a novel PCR restriction analysis of the *hsp65* as a rapid method to screen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex and Nontuberculous mycobacteria in high-burden countries - 2013 J Clin Microbiol; 51(4):1165-70

Vejlgaard TB, Haahr V, Peterslund NA. Atypical mycobacteria. - Disseminated infections in patients with haematologic diseases. - 1997 Ugeskr Laeg; 159: 5362-67

Viana-Niero C, Lima KV, Lopes ML *et al.* Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *M. bolletii* in outbreaks of infection after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. - 2008 J Clin Microbiol Mar 46 (3): 850-5

Von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T *et al.* Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. - 1993 J Clin Microbiol; 1: 3227-30

Von Reyn CF, Arbeit RD, Horsburgh CR *et al.* - Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in AIDS. - 2002 J Infect; 44:166-170

Wallace RJ Jr, O'Brein R, Glassroth J *et al.* - Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. - 1990 Am Rev Respir Dis; 142: 940-53

Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE – Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. - 1998 Annu Rev Microbiol 52: 453-90

Whipps CM, Lieggi C, Wagner R – Mycobacteriosis in zebrafish colonies - 2012 ILAR J 53(2):95-105

Wolinsky E - Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. - 1995 Clin Infect Dis; 20: 954-63

Wolinsky E - Mycobacterial diseases other than tuberculosis - 1992 Clin Infect Dis; 15: 1-12

Yamada-Noda M, Ohkusu K, Hata H *et al.* - *Mycobacterium* species identification: a new approach via *dnaJ* gene sequencing. - 2007 Syst Appl Microbiol 30: 453-62

Zanoni RG, Florio D, Fioravanti ML *et al.* - Occurrence of *Mycobacterium* spp in ornamental fish in Italy. - 2008 J Fish Dis Jun 31(6):433-41

Zelazny AM, Calhoun LB, Li L *et al.* - Identification of mycobacterium species by *Sec A 1* sequences. - 2005 J Clin Microbiol; 43: 1051-8

www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap1 - Cenni di filogenesi e tassonomia dei micobatteri

www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap3 – Le infezioni da micobatteri non tubercolari

www.mycobactoscana.it/Manuale/Cap8 - Identificazione dei micobatteri

